



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STANOVENÍ OBSAHOVÝCH LÁTEK VE  
FYTOFARMAKÁCH**

DETERMINATION OF SUBSTANCES IN PHYTOPHARMACEUTICALS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Iryna Ivanishchanka

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

**BRNO 2018**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1310/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Iryna Ivanishchanka**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název bakalářské práce:

Stanovení obsahových látek ve fytofarmakách

### Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat základní rešerši o přírodních léčivech aplikovaných na uklidnění.
2. Na základě rešerše zvolit metodu pro extrakci a identifikaci obsahových látek.
3. Provést analýzu vybraných čajů dostupných v ČR.
4. Zhodnotit výsledky.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Iryna Ivanishchanka  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

V předložené bakalářské práci byly analyzovány bylinné čaje, jejichž hlavními složkami jsou třezalka a meduňka. V rámci řešení bakalářské práce byly sledovány jejich fyziologické vlastnosti, chemické složení a vliv na zdraví člověka.

Práce se zabývá metodami izolace a identifikace silic z vybraných čajů pro uklidnění nervového systému. Pro izolaci silic jsou použity metody extrakce rozpouštědlem, mikroextrakce tuhou fází (SPME) a destilace vodní parou, a k identifikaci byla použita plynová chromatografie (GC/MS). Izolační metody pro získání silic z rostlinných matric byly posouzeny a jako nejvhodnější izolační technika byla určena metoda mikroextrakce tuhou fází (SPME)

## **ABSTRACT**

In the bachelor thesis, herbal teas, the main components of which are St. John's Wort and Lemon balm, were analyzed. The physiological properties, the chemical composition and the influence on human health were monitored.

Thesis deals method of isolation and identification of essentials oils from out of selected teas to calm the nervous system. For isolation of essentials oils there are used methods solvent extraction, solid phase microextraction (SPME) and steam distillation, for identification there is gas chromatography (GC/MS). Isolation methods for obtaining essential oils from plant matrices were assessed and the most appropriate isolation techniques was determined by solid phase microextraction (SPME)

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Fytofarmaka, silice, extrakce, extrakce pevnou fází SPME, destilace vodní parou, plynová chromatografie GC.

## **KEYWORDS**

Phytopharmaka, essentials oils, extraction, solid phase extraction SPME, steam distillation, gas chromatography GC.

IVANISHCHANKA, I. *Stanovení obsahových látek ve fytofarmakách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 32 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za odbornou pomoc a vstřícný přístup. Dále bych ráda poděkovala Ing. Ludmile Mravcové, Ph.D. za odbornou pomoc v laboratoři, a také za cenné rady a připomínky.

## Obsah

1	Úvod .....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Fytofarmaka.....	8
2.2	Čaje uklidňující nervový systém .....	8
2.3	Vybrané byliny .....	8
2.3.1	Třezalka tečkovaná ( <i>Hypericum perforatum</i> ) .....	8
2.3.2	Meduňka lékařská ( <i>Melissa officinalis</i> ) .....	10
2.4	Chemické složení silic .....	11
2.4.1	Monoterpeny .....	11
2.4.2	Seskviterpeny .....	13
2.4.3	Diterpeny .....	13
2.4.4	Triterpeny .....	14
2.4.5	Tetraterpeny .....	14
2.4.6	Polyterpeny.....	14
2.5	METODY PRO IZOLACI SILIC - EXTRAKCE.....	15
2.5.1	Destilace s vodní parou .....	15
2.5.2	Mikroextrakce tuhou fází – SPME.....	15
2.6	METODY POUŽITÉ PRO IDENTIFIKACI .....	16
2.6.1	Plynová chromatografie .....	16
2.6.2	Hmotnostní spektrometrie .....	18
2.6.3	Tandemová technika GC / MS .....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	20
3.1	Materiál.....	20
3.2	Přístroje, pracovní pomůcky, roztoky a chemikálie .....	20
3.2.1	Přístroje .....	20
3.2.2	Pracovní pomůcky .....	21
3.2.3	Chemikálie a roztoky .....	21
3.3	Pracovní postupy .....	21
3.3.1	Extrakce do hexanu .....	21
3.3.2	Odstranění chlorofylu pomocí silikagelu .....	21
3.3.3	Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS) .....	22
3.3.4	Destilace s vodní parou .....	22

3.3.5	GC-MS .....	23
3.3.6	Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) – suchý vzorek .....	23
3.3.7	GC-MS .....	23
3.3.8	Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) – výluhy z čajů .....	24
4	Výsledky a diskuse .....	24
4.1	Silice získané destilací vodní parou .....	24
4.2	SPME .....	25
4.3	Extrakce do hexanu .....	29
5	Závěr .....	31
6	LITERÁRNÍ ODKAZY: .....	32
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	36
8	Příloha .....	37

# 1 ÚVOD

Říše rostlin představuje obrovskou zásobárnu různých biologických aktivních látek, důležitých pro člověka, protože některé z nich mohou svou biologickou aktivitou ovlivňovat lidský život a lidský organismus. Jejich vliv však může být jak pozitivní, tak také negativní. Extrakty z rostlin mohou být obsaženy v celé řadě významných léčiv, avšak nutno si uvědomit, že mnoho rostlin obsahuje rovněž prudké jedy. Po mnoho tisíciletí se člověk snažil poznávat rostliny a znát jejich účinky. V současnosti člověk rostliny využívá v mnoha podobách, a to buď jako suroviny pro výrobu potravin, nebo přímo jako potraviny, případně jsou aplikovány jako krmivo pro hospodářská zvířata. Nezastupitelné jsou samozřejmě rovněž v dekorativním zahradnictví a při ochraně a při zlepšování životního prostředí, nebo jako fytofarmaka a suroviny pro výrobu léčivých přípravků.

Je známo, že současný život je plný stresu. Někdy, když se vrátíme domů, ještě dlouho se cítíme neklidní a vystresováni ze zážitků za celý den. Dlouho nemůžeme usnout a ráno se cítíme unaveně a rozbitě. Co s tím můžeme udělat? Jak je možné uklidnit nervový systém? Je skutečně nutné jít k lékaři a nechat si neustále předepisovat prášky na spaní? O většině synteticky vyrobených prášku na spaní je známo, že mají mnoho vedlejších účinků, jsou převážně návykové a příčinu nespavosti v podstatě nevyléčí.

Ke snížení nespavosti, nebo rovnou jako prostředku ke snadnému usínání, je můžeme aplikovat v jiné formě. Jsou to různé čaje připravované přímo z léčivých rostlin, které uklidňují nervový systém a napomáhají nám se uvolnit po stresu získaném v práci. V současnosti již existuje značné množství uklidňujících receptů na jejich přípravu, a proto si jednoduše můžete vybrat takový čaj, který Vám nejlépe vyhovuje. Kromě uklidňujících účinků na nervový systém mají tyto čaje řadu dalších užitečných vlastností a jejich léčebný účinek se vztahuje na celý lidský organismus.

Je třeba poznamenat, že šálek vhodného čaje večer je příjemný a přirozený způsob, jak se uklidnit a uvolnit po těžkém pracovním dni. Čaje, které uklidňují nervový systém, pomáhají dále odstranit zvýšenou podrážděnost a jsou nepostradatelným přípravkem při nespavosti a nervovém vyčerpání. Velice vhodnými přípravky na přírodní bázi jsou například NEOSPAN a PERSEN.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Fytofarmaka

Fytofarmaka jsou léčivé přípravky, které se připravují z rostlin nebo z některých jejich částí a neobsahují žádné synteticky připravené látky. Je známo, že rostliny, ze kterých se připravují fytofarmaka, obsahují většinou více účinných obsahových látek, a to na rozdíl od synteticky připravovaných léčiv, která převážně obsahují pouze jednu účinnou obsahovou látku. Syntetická léčiva bývají v porovnání s fytofarmaky sice v mnoha případech při léčbě účinnější, protože obsahují tuto obsahovou látku převážně v čisté podobě a vesměs také ve vyšších koncentracích, avšak pro lidský organismus se mohou stát návykovými. Kromě toho většinou obsahují další syntetické látky, které mohou podporovat vznik nežádoucích, případně vedlejších účinků, které v případě fytofarmak nebývají nijak výrazné. Syntetická léčiva mívají naopak vedlejší účinky i při malém dávkování [1].

Fytofarmaka se vesměs používají při podpůrné léčbě při těžších formách onemocnění. Často tvoří také základ některých syntetických léčiv. Přípravky rostlinného původu jsou velmi vhodné zejména při dlouhodobé aplikaci. Existuje mnoho různých bylin, které mohou mít rovněž nežádoucí dopad na lidský organismus. Lze proto konstatovat, že téměř na každé onemocnění lze aplikovat nějaké fytofarmakum, které může mít pozitivní vliv při jeho léčbě. Nutno si však uvědomit, že rostlina může být také jedem, nikoliv pouze lékem. Některé byliny mohou obsahovat jedy, především alkaloidy, které ovlivňují tělesné funkce a případně mohou poškodit plod u těhotných žen [1]. Proto je při jejich možné aplikaci se dohodnout s lékařem.

### 2.2 Čaje uklidňující nervový systém

V dnešní době si na běžném trhu můžeme zakoupit velké množství různých čajů. Čaje můžeme rozdělit podle způsobu zpracování do čtyř základních skupin: čaje bílé, čaje černé, čaje zelené a polozelené. Při výběru uklidňujícího čaje si musíte vybrat čaje, které obsahují nejvyšší hladinu enzymů a živin. Tento požadavek například splňuje heřmánkový čaj, mátový čaj, čaj z třezalky, levandulový čaj, zázvorový čaj a meduňkový čaj. Všechny tyto čaje jsou účinné proti stresu a uklidňují nervový systém [2].

### 2.3 Vybrané byliny

#### 2.3.1 Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*)

Třezalka je vytrvalá bylina, 30 až 60 cm vysoká, s větveným plazivým oddenkem. Třezalka má četně přímé a tuhé lodyhy se vstřícnými listy. Lodyhy jsou na průřezu oblé a mají pouze dva podélné úzké listy. Nekvetoucí lodyhy jsou jednoduché a husté olistěné, kvetoucí lodyhy jsou v horní části vidličnatě větvené. Velký počet tyčinek je rozdělen na tři svazky, svrchní semeník dozrává po oplození v žláznaté tobolky, které mají četné, krátké, šikmě pryskyřičné nádržky. Třezalka kvete od června do srpna. Celá rostlina musí být olistěná. Svazuje se do kytic a rozvěšuje se ve stínu, kde se rychle suší. Teplota při sušení by neměla přesáhnout 35°C [3],[4],[5][6].



Třezalka tečkovaná je druhem nejvíce rozšířeným v Evropě, severní Africe, v Asii a zasahuje až do střední Sibíře a na Altaj. Dobře snáší sucho a je velmi rozšířená, a to jak v nížinách, tak také ve vyšších polohách; kvete převážně na slunných místech. Kromě třezalky tečkované roste v České republice několik dalších druhů. Můžeme zde objevit zejména Třezalku skvrnitou (*H. maculatum* Crantz) a Třezalku čtyřkřídrou (*H. tetrapterum* Fries) [3],[4],[5][6].

V červenci a srpnu se sbírá kvetoucí nať, ze které je izolovaná droga *Herba hyperici*, která je používána především v lidovém léčitelství. Tato droga obsahuje z obsahových látek zejména katechinové třísloviny, flavonové glykosidy (hyperosid, rutin, kvercitrin), silice a hypericiny, případně hořčiny (6 až 15 %) a fenolická červená barviva s fotosenzibilizujícím účinkem. Obsah a poměr barviv závisí na lokalitě. Bylo prokázáno, že obsah tříslovin se v důsledku skladování snižuje [2,3,4,5].

Třezalka působí při léčbě velmi pozitivně. Bylo prokázáno, že má sedativní účinky, zlepšuje krevní oběh, zmírňuje dráždění a vylučování žluče. Rovněž je výborným prostředkem proti průjmům. V minulosti byla aplikována také při ledvinových a plicních chorobách, spáleninách, astmatu a nechutenství. Dnes je třezalková nať součástí léčebných čajů, které se aplikují při nervových obtížích všeho druhu a zejména při neklidném spánku [3],[4],[5][6].

#### **2.3.1.1 Chemické složení třezalky**

Třezalka obsahuje celou řadu biologicky aktivních látek. Z nich je nutné uvést především éterické oleje neboli silice (cineol, limonen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen), dále fenolické sloučeniny, flavonoidy (např. hyperosid, quercetin, isoquercitrin, quercitrin, amentoflavon a rutin), dále antrachinony, karotenoidy, kumarin, naftodianthrony (hypericin a pseudohypericin), phlorogluciny (hyperforin), deriváty kyseliny chinové (kyselina chlorogenová), xanthony, proanthokyanidiny, vitamíny a minerální látky [7][8][9][10].



Obrázek 1: Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*)[11].

### 2.3.2 Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*)

Meduňka lékařská je vytrvalá, ½ až 1 cm vysoká bylina, s hustě olistěnou rozvětvenou přímou lodyhou. Aromatické listy jsou vstřícné, řapíkaté, vejčité a hrubě pilovité. Kvete od května až do června [3],[4],[5][6].

Je velmi rozšířená, vyskytuje se zejména ve střední a jižní Evropě, dále na Balkáně, v Íránu, Severní Africe, Severní Americe, na Ukrajině, na Kavkaze a ve střední Asii. Rostlinu můžeme objevit na lesních loukách, podél řek a také v blízkosti silnic. Vyžaduje slunnou polohu a dává přednost sušším stanovištím. Pokud má dobré podmínky, vytváří velké množství nektaru. Tyto rostliny se mohou sbírat až třikrát za rok [3],[4],[5][6].

Sbírání se list, který obsahuje siličné drogy *Folium* a *Herba melissae*. Silice jsou těkavé, a proto za slunných parných dnů dochází ke snižování jejich obsahu. Listy se suší při teplotě 35°C, rozložené v tenkých vrstvách. Získaná rostlinná droga má citronovou vůni, intenzivní kořenitou chuť a zelenou až šedozelenou barvu. U staršího léčiva dochází ke snižování obsahu silic, a proto se nedoporučuje používat fytofarmaka obsahující meduňku starší než jeden rok [3],[4],[5][6].

Meduňka lékařská má také uklidňující účinky. Mírně snižuje krevní tlak, pomáhá při léčbě migrény a bolestech hlavy stressového původu. Využívá se rovněž při léčbě alergií, nachlazení a průjmů. Meduňkový čaj, který vypijeme, je schopen uklidnit tělo i mysl a také je vhodný při léčbě poruch spánku a nervů. Rovněž zpomaluje tep a snižuje krevní tlak. Proto se dnes většinou využívá při výrobě různých čajových směsí [3],[4],[5][6].

#### 2.3.2.1 Chemické složení meduňky

Meduňka obsahuje především silice, a to až 0,1 %. Těchto silic je však v listech obsaženo velmi málo, a proto je vyrobit toto fytofarmakum finančně velmi nákladné; jeden litr stojí na světovém trhu cca 3000 euro. Hlavními obsahovými složkami izolovaných silic jsou citral, citronelal, citronellol, geraniol, dále až 4 % tříslovin, hořčiny, kyseliny hydroxytriterpenové, například kyselina ursulová [3],[4],[5][6].



Obrázek 2: Meduňka lékařská (*Melissa officinalis*)[12].

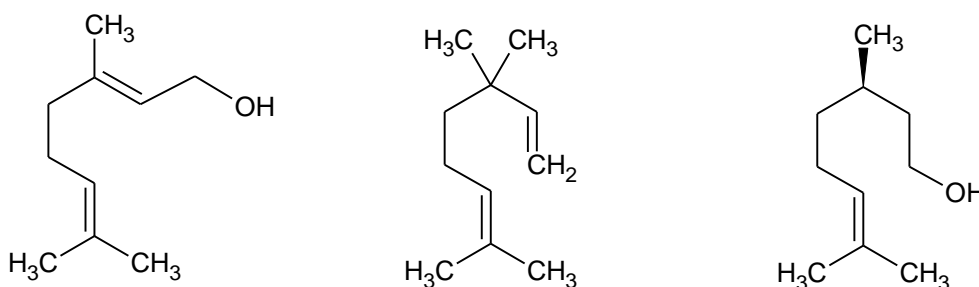
## 2.4 Chemické složení silic

Rostlinné silice jsou směsí lipofilních látek, které jsou odvozené od terpenoidů. V současnosti již bylo identifikováno více než 22 000 rozmanitých terpenoidů. Z chemického strukturního hlediska jsou na bázi acyklických i cyklických sloučenin, dále uhlovodíků a také sloučenin obsahujících atomy kyslíku [13].

### 2.4.1 Monoterpeny

Monoterpeny tvoří deseti uhlíkaté sloučeniny, které vznikly spojením dvou izoprenových jednotek [13]. Podle základního rozdělení rozeznáváme monoterpeny acyklické a cyklické. Již bylo prokázáno, že v přírodě se vyskytují buď jako uhlovodíky, případně jako jejich kyslíkaté deriváty, tj. alkoholy, aldehydy a ketony [14] [15].

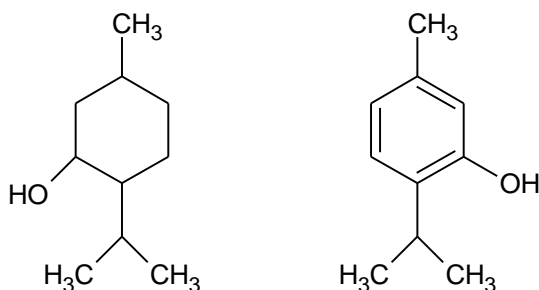
#### 2.4.1.1 Acyklické alkoholy



Obrázek 3: Geraniol, linalool, citronellol

Citronellol se nachází v růžové a geraniové silici. Linalol je terciární alkohol, který je hlavní složkou růžového oleje a který se v kyselém prostředí přesmykuje na dva geometrické izomery, geraniol a nerol. Citronellol má citronovou vůni a používá se k parfémování mýdel a také v potravinářském průmyslu [16].

#### 2.4.1.2 Monocyklické alkoholy

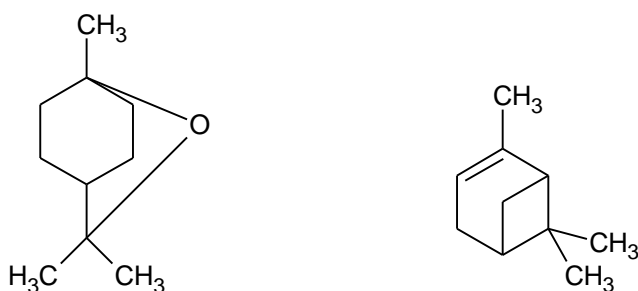


Obrázek 4: Menthol a thymol

Menthol je sekundární alkohol se třemi asymetrickými atomy, který má pět izomerů. Velký význam má především v kosmetice. Thymol je monoterpenový fenolový derivát cymenu,

kteřý je izomerický s karvakrolem a obsažený zejména v silici tymiánu. Thymol je bílá krystalická látka příjemné vůně a silných antiseptických vlastností [16].

#### 2.4.1.3 Bicyklické alkoholy

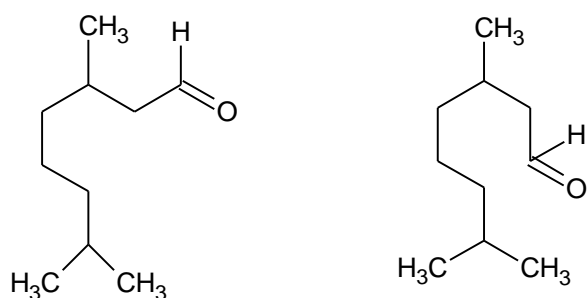


Obrázek 5: Eukalyptol a alfa - pinen

Eukalyptol je bezbarvá kapalina vyskytující se v přírodě. Eukalyptol je v některé literatuře také znám například jako 1,8-cineol, cineol, limonenoxid a kajeputol. Eukalyptol je složkou oleje rostliny *Eucalyptus globulus*. Eukalyptol tvoří až 90 % esenciálního oleje některých druhů eukalyptového oleje [16]. Vyskytuje v kafrovníku lékařském, bobkovém listu, kajeputu střídavolistém, pelyňku černobýlu, bazalce pravé, rozmarýně lékařské, šalvěji lékařské, případně rovněž v listech dalších aromatických rostlin. Eukalyptol má typickou kafrovou vůni [16].

Alfa-pinen se nachází v olejích mnoha druhů jehličnatých stromů, zejména borovic. Také je přítomen v esenciálním oleji rozmarýny (*Rosmarinus officinalis*). Racemická směs je součástí některých olejů, například oleje eukalyptu [16].

#### 2.4.1.4 Aldehydy



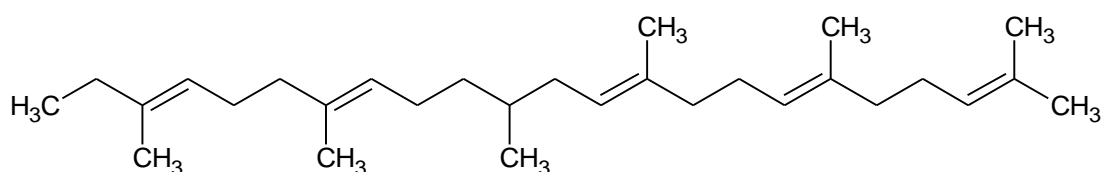
Obrázek 6: Citral a geranial

Citral je nejdůležitější z terpenových aldehydů. Vyskytuje se převážně v silicích, a to zejména v citronové, melisové a lemongrasové. Citral má typickou citronovou vůni a především se používá se k parfémování mýdel. Geranial je izomerem citralu [16].



#### 2.4.4 Triterpeny

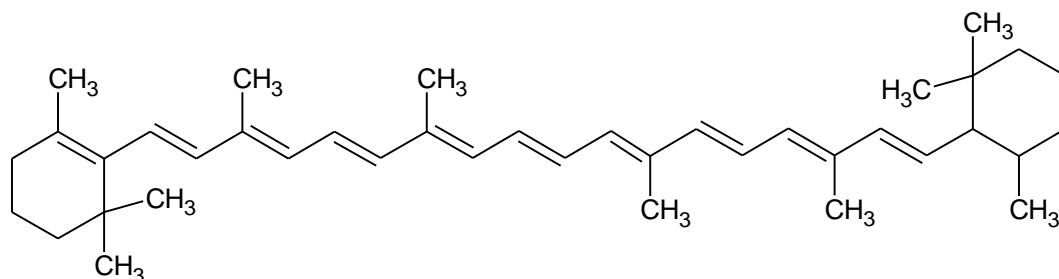
Triterpeny mají třiceti uhlíkatou molekulu složenou ze šesti izoprenových jednotek [13]. Prekurzorem biosyntézy triterpenů je skvalen, který se vyskytuje v orgánech živočichů; například se nachází v játrech žraloků. Žraločí skvalen je vzácnější a jeho cena je velmi vysoká, a proto se převážně využívá skvalen izolovaný z rostlin. Vyskytuje se především v olivovém oleji (až do 1 %) a také v pšeničných a rýžových otrubách [19].



Obrázek 10: Skvalen

#### 2.4.5 Tetraterpeny

Tetraterpeny mají čtyřiceti uhlíkatou molekulu složenou z osmi izoprenových jednotek [13]. Tetraterpeny jsou obsaženy především v rostlinách ve formě barviva karotenoidů. Beta-karoten slouží jako zdroj vitamínu A. Působí také jako antioxidant, protože pomáhá neutralizovat volné radikály. Skvalen, který se vyskytuje u živočichů, je obsažen v játrech žraloků, kde během probíhajících metabolických procesů v organismu tvoří reaktivní molekuly **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**

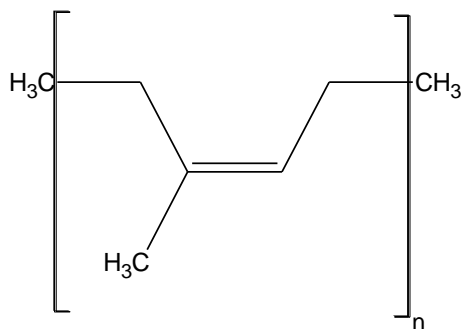


Obrázek 11:β-karoten

#### 2.4.6 Polyterpeny

Polyterpeny mají také čtyřiceti uhlíkatou molekulu, složenou rovněž z osmi izoprenových jednotek [13].

Přírodní kaučuk je polyterpen, získávaný ze stromu kaučukovníku (*Hevea brasiliensis*) [20]. Je elastický a nekystalický, protože má na dvojných vazbách konfiguraci cis [13].



Obrázek 12: Přírodní kaučuk

## 2.5 METODY PRO IZOLACI SILIC - EXTRAKCE

### 2.5.1 Destilace s vodní parou

Metoda, které je nejčastěji používána pro izolaci silic z rostlinných matric, je destilace s vodní parou. Pomocí této destilace s vodní parou získáváme sloučeniny, které jsou vesměs málo rozpustné ve vodě a při bodu varu mají velmi vysoký tlak nasycených par. Princip destilace s vodní parou je následující: vzorek se umístí do větší destilační baňky a při zahřívání se destilují analyty spolu s vodní parou; v centrální části destilačního zařízení kondenzují na chladiči. Na stejném chladiči kondenzují také páry destilovaného extrakčního činidla a tak zde dochází k extrakci. Kondenzát stéká po stěnách chladiče a v centrální části se odděluje těžší vodná fáze od lehčí fáze organické. Účinnost extrakce závisí na správném výběru extrakčního činidla. Volbou správného extrakčního činidla lze dosáhnout vysoké účinnosti extrakce. Extrakční činidlo by mělo mít nejmenší teplotu varu a podobnou polaritu jako sledované složky. Výhodou této metody je to, že se do extraktu nedostávají extrahovatelné balastní látky, například vosky, tuky a detergenty [22][23]**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**

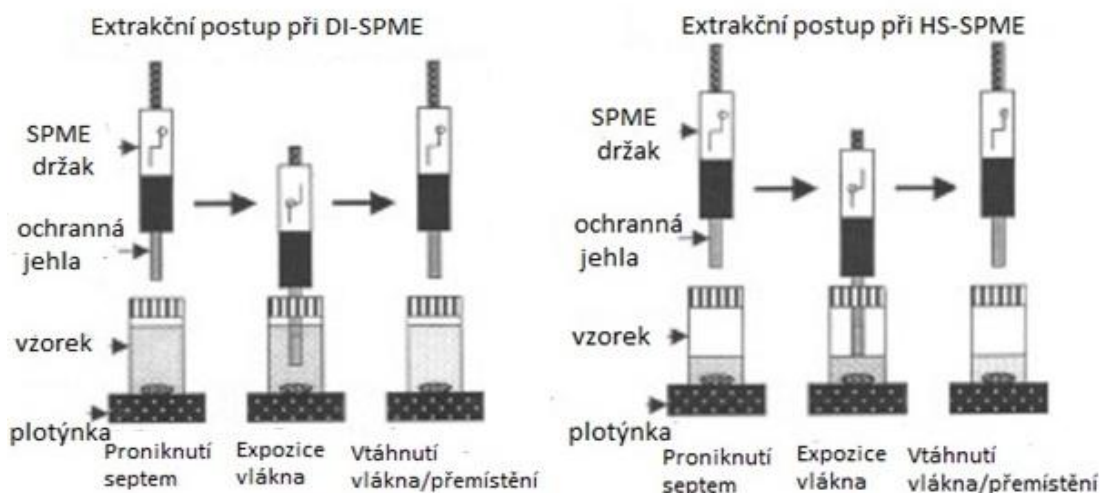
### 2.5.2 Mikroextrakce tuhou fází – SPME

Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase MicroExtraction - SPME) je jednoduchá a účinná sorpčně/desorpční technika, sloužící k izolaci a zakoncentrování analytu. Metoda SPME se používá jak pro kvalitativní, tak také pro kvantitativní stanovení. SPME metoda poskytuje lineární kalibrační křivku v širokém koncentračním rozmezí. Volbou vhodného typu vlákna lze dosáhnout reprodukovatelných výsledků i pro velmi nízké koncentrace analytů [24].

Přístroj SPME je velmi jednoduché zařízení. Z hlediska posouzení vzhledu vypadá jako modifikovaná injekční stříkačka, která se skládá z držáku vláken a vláknové části, která obsahuje 1-2 cm dlouhé zasouvací SPME vlákno [26].

Vlákno z taveného křemene je pokryté zakotvenou fází, kterou tvoří tenký polymer, například polydimethylsiloxan (PDMS). Vlákno je ponořeno do kapalného vzorku nebo může být umístěno nad kapalný vzorek do prostředí nasyceného těkavými analyty. Existují dva způsoby extrakce. První způsob je přímá SPME, která má zkratku DI-SPME (Direct Immersing SPME). U této metody dochází přímo k ponoření vlákna do vzorku. Druhá metoda je headspace (HS-SPME). Pro těkavé látky je vhodnější analýza headspace, kde nasorbované vlákno může být následně připojeno přímo k GC s hmotnostním detektorem (GC / MS). Pro

polární a netěkavé vzorky je nejvhodnější přímé ponoření (DI-SPME). Vzorkovací vlákna mohou být použita několikrát, v literatuře se někdy uvádí například stovky analýz v případě HS-SPME a deset použití v případě DI-SPME. Po určitou dobu probíhá sorpce na pevnou fázi. Po odběru vzorků se vlákno zasune do kovové jehly (pro mechanickou ochranu) a dalším krokem je přenos analytu sorbovaného na vlákno do chromatografu. Techniky HS-SPME a DI-SPME lze použít v kombinaci s libovolnými GC, GC / MS nebo HPLC a HPLC / MS systémy [26].



Obrázek 13: Extrakční postup při DI-SPME a HS-SPME [27].

## 2.6 METODY POUŽITÉ PRO IDENTIFIKACI

### 2.6.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je analytická metoda, která je založena na distribuci mezi dvěma heterogenními fázemi. Jedna fáze je nepohyblivá (stacionární) a druhá fáze je pohyblivá (mobilní). Obvykle tvoří nepohyblivou fázi sorpčně aktivní látka, jako pohyblivá fáze slouží převážně plyn. Tato analytická metoda je velmi citlivá, jednoduchá a vyznačuje se velkou separační účinností. Pomocí plynové chromatografie můžeme identifikovat a stanovit látky nejen plynné, ale také látky kapalně a pevné [28].

Plynová chromatografie umožňuje kromě využití v analytické chemii sledovat také sorpční děje, katalytické procesy, určovat termodynamické veličiny, sledovat mechanismus a kinetiku probíhajících reakcí a difuzní pochody [28].

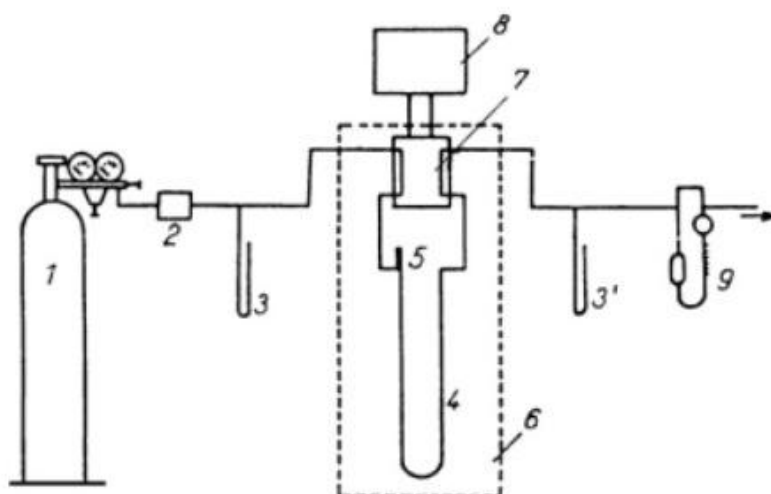
#### 2.6.1.1 Aparatura a pracovní postup

Měření se provádí na přístroji, jehož hlavní části jsou: zdroj a regulátor proudu nosného plynu, dávkovací systém, kolona umístěná v termostatu, termostaty pro dávkovač a kolonu, detektor, zapisovač a vyhodnocovací systém [28].



Ze zdroje plynu prochází plyn systémem čistícího a regulačního zařízení, které zbavuje plyn nežádoucích příměsí a kyslíku; průtok nosného plynu je pomocí tohoto regulátoru udržován konstantní. Jinými slovy, počet molů plynu procházející kolonou za jednotku času je konstantní. Dávkovací systém umožňuje, aby přesné množství vzorku bylo vloženo na kolonu. Následně potom dochází na koloně k rozdělení směsi látek na jednotlivé složky [28]. Existují dva typy kolon, náplňové a kapilární kolony. Náplňová kolona je trubice o průměru 1 a 3 mm, která je naplněna tuhous stacionární fází nebo tuhým nosičem, který je pokryt vrstvou kapalně stacionární fáze. Náplňové kolony jsou obvykle kovové a skleněné. Kapilární kolona je tenká skleněná trubice o průměru 0,1-6  $\mu\text{m}$ , která využívá jako nosiče stacionární fáze svou vnitřní stěnu. Kapilární kolony jsou většinou křemenné a skleněné. Jedinlivé složky jsou proudem nosného plynu po separaci převáděny z kolony do detektoru, který potom poskytuje signál **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**

Na základě určitých vlastností lze pro analýzu použít několik typů detektorů. Nejčastěji používanými detektory jsou tepelně-vodivostní detektor (TCD), plamenový ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchyty (ECD) nebo argonový detektor, případně detektor hmotnostní. Vyhodnocování se provádí pomocí software ChemStation, který je součástí vyhodnocovacího zařízení umístěného v počítači. Dávkovač, kolona a detektor musí být vždy termostatovány [28] [31].



Obrázek 14: Blokové schéma plynového chromatografu [32].

1-zdroj nosného plynu, 2-čistící zařízení, 3-regulační zařízení, 4-kolona,  
5-dávkovač, 6-termostat, 7-detektor, 8-zapisovač, 9-vyhodnocovací záření.

Výsledkem měření je grafický záznam, tzv. chromatogram. Chromatogram vyjadřuje závislost signálu detektoru na čase nebo na množství plynu prošlého kolonou [28]. Z chromatogramu můžeme získat informace o účinnosti dělení složek směsi, o kvalitativním, případně kvantitativním zastoupení složek ve směsi 0.

## 2.6.2 Hmotnostní spektrometrie

Zakladatelem hmotnostní spektrometrie je Sir Joseph J. Thompson (1856-1940). V roce 1911 dokázal J. J. Thompson rozlišit izotopy neonu pomocí prvního hmotnostního spektrometru. Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí, tj. iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a hmotnostního detektoru [33].

Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry) je metoda založena na měření poměru hmotnosti  $m$  a náboje  $z$  analyzované látky. Po nástřiku vzorku dochází k ionizaci a molekula získává náboj. Následně dochází k separaci nabitých částic v hmotnostním analyzátoru, a to podle jejich poměru  $m/z$ . Na detektor potom dopadají částice. Výsledkem toho měření je hmotnostní spektrum. Na ose x jsou zobrazena jednotlivá  $m/z$  a na ose y intenzita iontů o daném  $m/z$  [33].



Obrázek 15: Schéma hmotnostního spektrometru [33].

### 2.6.2.1 Ionizační techniky

Ionizační techniky dělíme na tzv. tvrdé a měkké. Nejčastěji se pro ionizace biomolekul používají ionizace elektrosprejem (ESI – electrospray ionisation) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI – matrix-assisted laser desorption/ionization). Tyto metody patří mezi měkké ionizační techniky [35].

Elektrospray ionizace (ESI) je ionizační technika, která se používá pro malé a velké množství molekul, jako jsou peptidy, proteiny, organokovové sloučeniny a polymery. Zdroj ESI pracuje při atmosférickém tlaku. Roztok vzorku se vstříkují z malé trubice do silného elektrického pole v přítomnosti toku teplého dusíku, který napomáhá desolvataci. Vzniklé kapičky se odpařují v prostředí udržovaném ve vakuu několika torrů, které způsobují, že náboj na kapkách vzrůstá. Vícenásobně nabití ionty pak vstupují do analyzátoru [35].

Vzorek pro MALDI je rovnoměrně mísen ve velkém množství matrice. Matrice absorbuje UV záření a přeměňuje je na tepelnou energii, a následně v elektrickém poli putuje k detektoru [35].

### 2.6.2.2 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor jsou měřiče doby průletu iontů (TOF), iontové pasti (IT) a kvadrupólové analyzátor (Q) [36].

Kvadrupóly jsou složeny ze čtyř paralelních kovových tyčí, které tvoří elektrické pole. Vždy dvě protilehlé tyče jsou připojeny ke stejnému napětí se stejnosměrnou a střídavou složkou. Kvadrupól propouští ionty jen o určitém  $m/z$ , a to změnou napětí v tyčích. Pro analýzu anorganických a lehce nebo středně těžkých organických sloučenin jsou používány kvadrupóly [37].

Hmotnostní spektrometr časového průletu (TOF) je analyzátor, který urychluje ionty pomocí impulsu. Ionty jsou zrychleny tak, aby měly stejnou kinetickou energii předtím, než vstoupí do oblasti bez volných polí, známé také jako letová trubka. Analyzátor TOF odděluje ionty časem bez použití elektrického nebo magnetického pole. V surovém smyslu je TOF podobný chromatografii, pouze s výjimkou toho, že neexistuje žádná stacionární / mobilní fáze. Místo toho je oddělení založeno na kinetické energii a na rychlosti iontů [37].

Iontová past se skládá především z prstencové střední elektrody a dále ze dvou kruhových elektrod s hyperbolickým průřezem [37].

Analyzátor iontů zachytává oddělené ionty na základě jejich hodnoty  $m/z$ . Zachycují ionty po určitou dobu v centrální komoře, než postupně tyto ionty uvolní na základě jejich hodnot  $m/z$ , čímž vytvoří hmotnostní spektrum. Analyzátor iontových pastí vykazuje lepší citlivost v porovnání s kvadrupóly. Iontové pasti jsou stabilní, citlivé a nejsou příliš finančně nákladné [37].

### 2.6.2.3 Detektor

Detektor je poslední částí hmotnostního spektrometru. Ionty dopadající na detektor vytváří elektrický proud úměrný jejich množství. Detektor následně poskytuje signál, který je zaznamenán v počítači. Mezi nejznámější detektory patří Faradayův detektor a elektronový násobič [38].

### 2.6.3 Tandemová technika GC / MS

Plynová chromatografie (GC nebo GC/MS) je jednou z přednostně používaných technik v environmentální analýze. V tomto případě probíhá tepelná desorpce analytu v horkém GC injektoru. Chromatografie a detekce probíhají běžným způsobem. Výběr mezi vzorkováním a chromatografií závisí především na polaritě a volatilitě analytů [26].

Analýza dat se provádí technikou obráceného hledání v knihovně. Výhoda metody spočívá v tom, že můžeme zároveň analyzovat dvě i více látek eluovaných současně. Počítač identifikuje určitý záznam, který zůstane v paměti a odečte jej od údajů nové analýzy. Nevýhodou je to, že nemůžeme lokalizovat ani identifikovat látky, které nejsou zakomponovány do paměti počítače **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..**

Kombinace plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) se používá zejména v kriminalistice a soudním lékařství, dále ve farmaceutické stopové analýze a ve stopové analýze kontaminantů obsažených v potravinách [39].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiál

Pro stanovení obsahových látek byly použity čtyři různé druhů čajů a tobolky pro uklidnění nervového systému.

Byly analyzovány tyto druhy čajů:

Tabulka 1: Použité čaje

Čaj	Složení	Výrobce
Třezalka nať	<i>Hyperici herba</i> (Třezalka nať)	Leros
Meduňka lékařská nať	<i>Melissa officinalis</i> (meduňková nať)	Leros
Balzám na nervy	<i>Melissae herba</i> (meduňka list), <i>Mentha piperita</i> (máta list), (mučenka nať), <i>Lavandula</i> (levandule květ).	Oxalis
Nervová čajová směs	<i>Valerianae radix</i> (kozlíkový kořen) <i>Melissae herba</i> (meduňková nať) <i>Menthae piperitae herba</i> (nať máty peprné) <i>Foeniculi fructus</i> (fenyklový plod)	Megafyt Pharma

Kromě těchto čajů byla analyzovaná tableta léčebného přípravku Persen Forte, výrobce Sandoz, která obsahuje *Valerianae extractum siccum* (suchý kozlíkový extrakt), *Melissae folii extractum siccum* (suchý meduňkový extrakt) a *Menthae piperitae folii extractum siccum* (suchý extrakt z listu máty peprné).

#### 3.2 Přístroje, pracovní pomůcky, roztoky a chemikálie

##### 3.2.1 Přístroje

- analytické váhy (SARTORIUS)
- plynový chromatograf AGILENT TECHNOLOGIES 6890N (USA)
- modré SPME vlákno PDMS/DVB, 65 µm, Fused Silica/SS
- šedé SPME vlákno DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm, Stable Flex/SS (1cm)
- hmotnostní spektrometr Pegasus III, firma LECO (USA)
- magnetická míchačka MK 418, fy NÜVE

### 3.2.2 Pracovní pomůcky

- kádinky
- nálevky
- vialky 10 ml
- pipety
- filtrační papíry
- stojan
- držáky
- míchadlo
- topné hnízdo
- destilační baňka 1000 ml se zábrusem
- speciální destilační nástavec (podle Českého lékopisu 2002)

### 3.2.3 Chemikálie a roztoky

- ethanol fy MERCK
- petrolether fy MERCK
- hexan fy SIGMA- ALDRICH
- síran sodný bezvodý fy PENTA
- silikagel fy SIGMA- ALDRICH
- helium, 6.0

## 3.3 Pracovní postupy

### 3.3.1 Extrakce do hexanu

Na analytických vahách bylo naváženo 0,5 g každého vzorku. Vzorek byl kvantitativně převeden do vialek o objemu 12 ml. K připraveným vzorkům bylo nepipetováno 10 ml hexanu. Takto připravený vzorek byl ponechán celý den (24 hod.) v chladnici; potom byly extrakty přefiltrovány přes filtrační papír a opět uchovávány v chladnici až pro následující analýzu.

### 3.3.2 Odstranění chlorofylu pomocí silikagelu

Extrakty získané pomocí extrakce do hexanu byly zahuštěny dusíkem. Pro zahuštění vzorků byla použita jehlová odpařovačka. Na počátku preanalytické metody byla připravena kolona. Kolona byla naplněna hexanem a potom byl postupně přisypáván a sklepáván aktivovaný silikagel, a to až do předem určené výšky (25 – 30 cm). Nakonec byl přebytečný hexan odkapán z kolony. Pomocí Pasteurovy pipety byly na počátek připravené kolony se silikagelem nanесeny vzorky. Po nanесení extraktu ze vzorku bylo přidáno 5 ml hexanu. Až se veškerý hexan vsákl na silikagelovou kolonu, bylo přidáno 10 ml hexanu, který byl potom odkapán do vialky o objemu 12 ml. Na kolonu bylo přidáno 5 ml petroletheru a po jeho odkapání bylo přidáno ještě 10 ml petroletheru, který byl odkapán do vialky o objemu 12 ml. Všechn extrakt umístěný ve vialkách byl vysušen pomocí dusíku. Potom byl do vialek napipetován 1 ml hexanu. Pomocí Pasteurovy pipety byly do vialek přemístěny všechny extrakty, které byly připraveny pro analýzu plynovou chromatografií.

### 3.3.3 Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS)

Všechny extrakty z čajů byly proměřeny na plynovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem jako detektorem (GC/MS-TOF).

#### **Pracovní podmínky pro analýzu plynovou chromatografií:**

GC/MS-TOF (Agilent Technologies 6890; Network GC System)

Kolona: HT-5 (28 m × 0,25 mm; 0,25 μm).

Nástřík splitless; SPME; He 1 ml·min<sup>-1</sup>.

250° C inlet

Teplotní program: 40° C po dobu 1 min; 25° C/min do teploty 300 °C;

#### **Pracovní podmínky hmotnostního spektrometru**

Rozmezí hmot 20 – 550.

Scanovací rychlost 10 sp/s.

Napětí na detektoru 1800 V.

Teplota iontového zdroje 250° C.

Software: LECO® ChromaTOF optimized for Pegasus III.



*Obrázek 16: Přístroj GC-MS*

### 3.3.4 Destilace s vodní parou

Byla sestavena aparatura pro destilaci s vodní parou (Obrázek 17: Destilační aparatura). Do baňky o objemu 1000 ml bylo naváženo 5 g čaje, vloženy varné kamínky a přidáno 250 ml destilované vody. Do destilačního nástavce byla nepipetována destilovaná voda a přidány 2 ml hexanu. Obsah byl přiveden k varu a destilace probíhala dvě hodiny. Po ukončení destilace byla vodní fáze odstraněna a hexanová fáze byla kvantitativně převedena do vialky o objemu 4 ml. Pro odstranění zbytků vodné fáze byl následně použit síran sodný bezvodý. Malé množství síranu bylo rovněž přidáno do vialky. Po usazení vrstvy síranu byla hexanová fáze odpipetována do vialek určených pro analýzu plynovou chromatografií.



*Obrázek 17: Destilační aparatura*

### **3.3.5 GC-MS**

Podmínky pro plynovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii byly nastaveny stejně, jako při analýze vzorků po vyčištění na silikagelových kolonách.

### **3.3.6 Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) – suchý vzorek**

Obsah čajového sáčku byl nasypán do vialky. Dále byla vialka na 10 minut umístěna do sušárny vyhřáté na teplotu 50 °C. Po vyjmutí vialky ze sušárny bylo přes septum vsunuto vlákno pro SPME a absorpce probíhala 20 minut při laboratorní teplotě. Pro všechny vzorky bylo použito jak modré, tak také šedé vlákno.

### **3.3.7 GC-MS**

Vlákna byla ručně umístěna do plynového chromatografu (Obrázek 18: Vlákno SPME).



*Obrázek 18: Vlákno SPME*

### **3.3.8 Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) – výluhy z čajů**

Byl uvařen čaj podle návodu na obalu. Část čaje bylo přelito do velké vialky. Přes septum bylo do vzorku ponořeno vlákno pro SPME a za stálého míchání na magnetické míchačce probíhala po dobu 20 minut sorpce. Potom byl vzorek ponechán v laboratoři a po třech hodinách bylo vlákno pro SPME znovu bylo ponořeno do vialky. Byla provedena sorpce na šedé i na modré vlákno. Všechny čaje byly vyluhovány ve 250 ml vroucí vody.

## **4 VÝSLEDKY A DISKUSE**

Pomocí metody GC-MS byly analyzovány všechny vzorky. Pro identifikaci látek byla použita databáze NIST. Na základě literární rešerše byly vybrány analyty, které běžně obsahují silice vybraných bylin. Výsledky identifikovaných/stanovovaných látek jsou uvedeny v tabulkách a na chromatogramech, které jsou prezentovány v přílohách. Látky byly stanoveny metodou GC/MS s chromatografickým záznamem TIC.

### **4.1 Silice získané destilací vodní parou**

V tabulkách (Tabulky 2-5) jsou uvedeny základní údaje o identifikaci obsahových látek přítomných v silicích izolovaných z daných vzorku destilací s vodní parou. Z výsledků vyplývá, že v silici izolované z rostliny Meduňka lékařská nať byl nalezen  $\beta$ -citral.

V silicích izolovaných z čaje „Třezalka nať, Balzám na nervy, Nervová čajová směs“ se po izolaci pomocí destilace s vodní parou podařilo identifikovat tyto obsahové látky: alfa-pinen, estragol, levomenthol, humulen, caryophyllen. Z výsledků vyplynulo, že se jedná o látky, které se rovněž obvykle vyskytují v silicích. Ze všech získaných výsledků je zřejmé, že



pomocí této metody lze izolovat a následně identifikovat i takové obsahové látky, jako je thymol a phytol.

Pomocí metody destilace vodní parou byly u čajů „Třezalka nat“ identifikovány následující obsahové látky, které jsou pro přehlednost uvedené v tabulce 2.

*Tabulka 2: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Třezalka nat“*

alfa-pinen	thymol	levomenthol	caryophyllen
estragol	humulen	spathulenol	carvon

Pomocí metody destilace vodní parou byly u čajů „Meduňka lékařská nat“ identifikovány následující obsahové látky, které jsou pro přehlednost také prezentovány v tabulce 3.

*Tabulka 3: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Meduňka lékařská nat“*

alfa-pinen	thymol	levomenthol	caryophyllen
estragol	humulen	alfa-copaen	phytol
β-citral			

Pomocí metody destilace vodní parou byly u čajů „Balzám na nervy“ identifikovány následující obsahové látky, které jsou prezentovány v tabulce 4.

*Tabulka 4: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Balzám na nervy“*

alfa-pinen	copaen	spathulenol	caryophyllen
eucalyptol	thymol	phytol	eugenol

Pomocí metody destilace vodní parou byly u čajů „Nervová čajová směs“ identifikovány následující obsahové látky, které jsou uvedeny v tabulce 5.

*Tabulka 5: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Nervová čajová směs“*

alfa-pinen	estragol	3-octanol	caryophyllene
eucalyptol	menthyl acetát	phytol	L-Fenchone

## 4.2 SPME

Pomocí izolace silic metodou SPME byly u čajů „Třezalka nat“ identifikovány následující obsahové látky, které jsou uvedeny v tabulce 6. Modře podbarvené látky byly zjištěny pouze pomocí modrého vlákna a šedé pouze pomocí vlákna šedého. Látky, které nejsou označeny žádnou barvou, byly izolovány pomocí obou vláken.

Tabulka 6: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Třezalka nat“

Název	Suchý vzorek	Vařený čaj	Výluh 3h
Caryophyllen	+		
Citronellal	+		
Estragol	+	+	+
alfa-Pinen	+		
(R)-citronellol	+	+	+
Carvon	+	+	+
Menthyl acetát	+	+	+
L-Menthon	+	+	+
Levomenthol	+	+	+
Isopulegol	+		
Limonen	+	+	
Germacren D	+		
Ledol	+		
Copaen	+	+	+
Geraniol		+	
Linalool		+	+
Thymol		+	+
Eugenol			+

Z této tabulky dále vyplývá, že pomocí všech tří postupů byly vesměs identifikovány copaen, l-menthon, carvon, estragol, (R)-citronellol, menthyl acetát. Z výsledků získaných pro suchý vzorek čaje je zřejmé, že tento čaj obsahuje jako hlavní složku obsahovou látku přítomnou zejména v třezalce - citronellal. Z tabulky rovněž vyplývá, že v čaji „Třezalka nat“ bylo identifikováno více obsahových látek, z nichž některé se od sebe liší jak strukturou, tak rovněž polohou substituentu.

Pomocí metody SPME u čajů „Meduňka lékařská nat“ byly identifikovány následující látky, které jsou uvedené v tabulce 7. Modře podbarvené látky byly zjištěny pouze pomocí modrého vlákna a šedé pouze pomocí vlákna šedého. Látky, které neoznačeny žádnou barvou byly zjištěny po izolaci prostřednictvím obou vláken.

Z tabulek vyplývá, že pomocí třech postupů byly vesměs identifikovány citronelal, estragol, isopulegol. U vařeného čaje a u čaje, který byl ponechán tři hodiny odstátý v laboratoři bylo zjištěno, že u obou čajů byly jako důležité obsahové složky prokázány obsahové látky izolované z meduňky, tj. cis-geraniol a citral. Z tabulky je rovněž zřejmé, že u čaje „Meduňka lékařská nat“ bylo identifikováno více obsahových látek, z nichž některé se od sebe liší strukturou a polohou substituentu.

Pomocí metody SPME u čajů „Balzám na nervy“ byly identifikovány následující obsahové látky, které jsou uvedené v tabulce 7. Modře podbarvené látky byly zjištěny pouze po izolaci pomocí modrého vlákna a šedé pouze pomocí vlákna šedého. Látky, které nejsou v tabulce označeny žádnou barvou, byly izolovány pomocí obou vláken a následně identifikovány.

Tabulka 7: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Meduňka lékařská nat“

Název	Suchý vzorek	Vařený čaj	Výluh 3h
Caryophyllen	+		
Citronellol	+	+	+
Estragol	+	+	+
alfa-Pinen	+	+	
Carvon		+	+
Menthyl acetát	+		+
L-Menthon		+	+
Levomenthol	+		+
Isopulegol	+	+	+
Copaen	+		
Cis-Geraniol		+	
Linalool		+	
Thymol			+
Eugenol		+	+
Humulen	+		
Pulegon	+		
á-Bourbonen	+		
L-Fenchon	+		+
Eucalyptol		+	+
Thujon		+	
Citral			+

Tabulka 8: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Balzám na nervy“

Název	Suchý vzorek	Vařený čaj	Výluh 3h
Estragole	+		
à-Pinene	+	+	+
Menthyl acetate		+	
L-Menthone		+	
D-Limonene	+	+	
Copaene	+		
Thymol		+	+
Eucalyptol	+	+	
Pulegone	+		

Humulene	+		
Pyridine	+		
á-Bourbonene	+		
Coumarin		+	+
Glycerin			+

Z tabulky 8 vyplývá, že prostřednictvím všech tří postupů byly v čaji „Balzám na nervy“ vesměs identifikovány alfa-pinen a eucalyptol. Z tabulky je zřejmé, že bylo identifikováno více obsahových látek, z nichž některé se od sebe liší strukturou a polohou substituentu. U čaje, který byl ponechán 3 hodiny odstát v laboratoři, byl navíc identifikován glycerin.

Pomocí metody SPME byly u čajů „Nervová čajová směs“ identifikovány následující obsahové látky, které jsou uvedeny v tabulce 9. Modře podbarvené látky byly zjištěny pouze pomocí modrého vlákna a šedé pouze pomocí vlákna šedého. Látky, které nejsou označeny žádnou barvou, byly z čaje izolovány pomocí obou vláken.

Tabulka 9: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Nervová čajová směs“

Název	Suchý vzorek	Vařený čaj	Výluh 3h
Caryophyllene	+		
Estragole			+
à-Pinene	+	+	+
Menthyl acetate		+	
L-Menthone			
Levomenthol	+		+
Isopulegol	+		
Linalool		+	+
L-Fenchone			+
Eucalyptol	+	+	+
Thujone	+	+	
Citral			+
β-Citral			+
Citronellol			+
Isovaleric acid	+		
Germacrene D	+		
Limonene	+		
3-Octanol		+	
Methyleugenol			+

Z tabulky 9 dále vyplývá, že pomocí všech tří izolačních postupů byly v extraktech vesměs identifikovány eucalyptol a alfa-pinen. U vařeného čaje, který byl ponechán 3 hodiny odstát v laboratoři, bylo po analýze zjištěno, že tato směs obsahuje ještě linalool. Rovněž je zřejmé, že tento výluh obsahuje další důležité obsahové látky přítomné v meduňce, jako jsou citral, β-citral a citronellol. Z tabulky také vyplývá, že v čaji „Nervová čajová směs“ bylo

identifikováno více obsahových látek, z nichž některé se od sebe liší pouze strukturou a polohou substituentu.

Pomocí metody SPME byly u tablety „Persen Forte“ identifikovány následující obsahové látky, které jsou rovněž prezentovány v následující tabulce 10. Modře podbarvené látky byly i v tomto případě izolovány pouze pomocí modrého vlákna a šedé pouze pomocí vlákna šedého. Látky, které nejsou označeny žádnou barvou, byly izolovány z matrice a následně identifikovány pomocí obou vláken.

*Tabulka 10: Výsledky stanovení obsahových látek v tabletě „Persen Forte“*

alfa-Pinen	Caryophyllen	L-Menthon	Humulen
Guajol	Ledol	Endo-Borneol	alfa-Terpineol

Z tabulky 10 vyplývá, že pomocí modrého vlákna se podařilo izolovat guajol a ledol. Prostřednictvím šedého vlákna byly z tablety „Persen Forte“ izolovány l-menthon, humulen, alfa-pinen a pomocí obou vláken byly izolovány caryophyllen, endo-borneol, alfa-terpineol.

### 4.3 Extrakce do hexanu

Poslední výsledky (tabulky 11 – 15) uvádějí zjištěné údaje o identifikaci obsahových látek přítomných v silicích, izolovaných extrakcí do hexanu. Tato izolační metoda nám neposkytla nové zajímavé informace o obsahových látkách izolovaných z vybraných čajů. Ve třech čajích byly stanoveny obsahové látky alfa-Pinen, eicosan a caryophyllen. Látka eicosan však byla izolována pouze při extrakci do hexanu. Tableta Persen Forte obsahovala endo-Borneol, levomenthol, spathulenol a phytol.

*Tabulka 11: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Třezalka nat“*

alfa-pinen	eicosan	limonen	alfa-bourbonen
copaen			

*Tabulka 12: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Meduňka lékařská nat“*

alfa-pinen	limonen	eicosan	alfa-bourbonen
germacren D	caryophyllen	copaen	

*Tabulka 13: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Balzám na nervy“*

humulen	alfa-pinen	eicosan	limonen
germacren D	caryophyllen		

*Tabulka 14: Výsledky stanovení obsahových látek v čaji „Nervová čajová směs“*

L- menthon	alfa-pinen	copaen	humulen
------------	------------	--------	---------

alfa - gaiene	alfa -cubeben	alfa -murolen	menthol
Caryophyllen			

*Tabulka 15: Výsledky stanovení obsahových látek v tabletě „Persen Forte“*

endo-borneol	levomenthol	spathulenol	phytol
--------------	-------------	-------------	--------

## 5 ZÁVĚR

Byly analyzovány bylinné čaje různých značek, které jsou prodávány pro uklidnění nervového systému a jejichž hlavními složkami jsou třezalka a meduňka. K identifikaci byl použit plynový chromatograf v kombinaci s hmotnostní spektrometrií jako detektorem. Analýzou bylo prokázáno, které obsahové látky se v rostlinách nacházejí. Pro izolaci z matrice byla použita extrakce rozpouštědlem (hexan), mikroextrakce tuhou fází (SPME) a destilace vodní parou.

Bylo prokázáno, že nejvhodnější a nejúčinnější metodou pro izolaci obsazených látek je metoda SPME. Pomocí metody SPME pro izolaci z matrice se podařilo identifikovat více důležitých obsahových látek, které jsou obsaženy ve vybraných čajích. Pokud chceme zjistit pouze informace o kvalitativním složení, tak je tato metoda pro screeningovou analýzu vhodná.

Na základě měření prováděného v rámci prováděných experimentů při řešení bakalářské práce bylo také zjištěno, že v čaji, který stál po dobu 3 hodin, bylo obsaženo méně obsahových látek, než v čaji, které byl změřen ihned po vyluhování. Nejméně vhodnou metodou pro izolaci silice z čajů byla extrakce rozpouštědlem, do hexanu. V porovnání s ostatními izolačními metodami neumožnila tato metoda izolaci většího množství obsahových látek.

V porovnání s literární rešerší je možno konstatovat, že byly identifikovány ty obsahové látky, které by se měly nacházet ve vybraných rostlinách.

## 6 LITERÁRNÍ ODKAZY:

- [1] *Fytofarmakum* [online]. [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <https://leky.vitalion.cz/fytofarmakum/>
- [2] *Fytofarmakum* [online]. [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <http://bylinkopedie.cz/bylinky-na-nervy/>
- [3] RUBCOV, V. G., RNDr. Karel BENEŠ a František SEVERA. *Zelená lékárna*. 1. Vydání. Praha: Lidové nakladatelství, 1984
- [4] ENDRIS, Zdeněk, MUDr. Jaroslav KORBELÁŘ, CSC. a Jindřich KREJČA. *Naše rostliny v lékařství*. 7. vydání. Praha: Avicenum, N. P., Zdravotnické nakladatelství, 1981.
- [5] DEYL, Miloš a Květoslav HÍSEK. *Naše květiny I, II*. 2. vydání. Praha: Albatros, 1980.
- [6] MAYER, Johannes Friedrich, Kilian SAUM a Bernhard UEHLEKE. *Bylinky z klášterní lékárny: více než 100 léčivých rostlin: přesné receptury pro úspěšné domácí použití*. V Praze: Knižní klub, 2004. ISBN 80-242-1099-1.
- [7] RAMALHETE, Nuno, Alexandra MACHADO, Rita SERRANO, Elsa T. GOMES, Helder MOTA-FILIPPE a Olga SILVA. Comparative study on the in vivo antidepressant activities of the Portuguese *Hypericum foliosum*, *Hypericum androsaemum* and *Hypericum perforatum* medicinal plants. *Industrial Crops and Products* [online]. 2016, 82(1), 29-36 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.014. ISSN 0926-6690. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015306038>.
- [8] KLEMOW, Kenneth, Andrew BARTLOW, Justin CRAWFORD, Neil KOCHER, Jay SHAH a Michael RITSICK. Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects* [online]. 2011, 11(2), 211-237 [cit. 2018-05-12]. DOI:10.1201/b10787-12. Dostupné z : <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b10787-12>
- [9] JÜRGENLIEMK, Guido a Adolf NAHRSTEDT. Phenolic Compounds from *Hypericum perforatum*. *Planta Medica* [online]. 68(1), 88-91 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1055/s-2002-20053. ISSN 00320943. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2002-20053>
- [10] KOYU, Halil a Mehmet Zeki HAZNEDAROGLU. Investigation of impact of storage conditions on *Hypericum perforatum* L. dried total extract. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2015, 23(3), 545-551 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.04.002. ISSN 1021-9498. Dostupné z:



<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949815000459>.

- [11] Třezalka Tečková pro klid a pohodu [online]. [cit. 2018-05-12]. Dostupné z : <http://whiteshadow.blog.cz/1407/trezalka-teckovana-pro-klid-a-pohodu>
- [12] Meduňka lékařská [online]. [cit. 2018-05-12]. Dostupné z t: <http://www.living-portal.cz/bylinky-v-nasi-zahrade-medunka-lekarska/> [cit. 2018-05-12].
- [13] MCMURRY, Susan. Studijní příručka a řešené příklady: k českému vydání učebnice John McMurry: Organická chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, c2009. ISBN 978-80-7080-723-1.
- [14] KUBIŠ I., KOUTNÝ, T., PÁRAL, V.: Stanovení silic v kořeni pomocí separačních postupů. SPŠCH, Brno 2008, 58 s. Středoškolská odborná činnost.
- [15] [12] KRESÁNEK, J., KRESÁNEK, J.(1999): Zázrak zvaný silice. Liečivé rostliny, 36: 190-197.
- [16] KOVÁČ, Jaroslav, Ľubor FIŠERA a Štefan KOVÁČ. Organická chémia. [2. vyd.]. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1995. ISBN 80-227-0791-0.
- [17] FARNESOL [online]. [cit.2018-05-12]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/vyhledat-slozeni/farnesol/>
- [18] Fytol [online]. [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/fytol>
- [19] TSCHIGGERL, Christine, Peter BUCAR, Gregor PAWLITZKI a Bernd HEMPEL. On the Absolute Configuration of Matricin. Plant Foods for Human Nutrition. 2012, vol. 67, issue 2, s. 129-135. DOI: 10.1007/s11130-012-0277-1. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2001-11998>
- [20] Beta-Karoten [online]. [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <https://www.celostnimedica.cz/beta-karoten.htm#ixzz5AIODjMHg>
- [21] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. Barevný atlas biochemie. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012, xiv, 498 s. ISBN 978-802-4729-770.
- [22] Separační metody-destilace [online]. [cit. 2018-05-12]. Dostupné z: <http://www.kralupy.cz/dg/www2/stranky/chemie/destilace.htm>
- [23] [20] CHURÁČEK, Jaroslav. Analytická separace látek. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.

- [24] CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0010-0
- [25] Procházková, D.: Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy* 96, 827–852 (2002).
- [26] VAS, György a Károly VÉKEY. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2004, 39(3), 233-254 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1002/jms.606. ISSN 1076-5174. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.606>
- [27] *Journal of Chromatography A*, 880, Kataoka H, Lord LH, Pawliszyn J, Applications of solid-phase microextraction in food analysis, page 40, Fig. 3, Copyright (2000), with permission of Elsevier.
- [28] SMOLKOVÁ, Eva a Ladislav FELTL. *Analýza látek v plynném stavu*. Praha: SNTL, 1991.
- [29] ZÝKA, Jaroslav. *Analytická příručka*. 4. upr. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1988.
- [30] *Plynova chromatografie* [online]. [cit. 2018-05-21] Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~koplikr/%C4%8C%C3%A1stA6\\_3.pdf](https://web.vscht.cz/~koplikr/%C4%8C%C3%A1stA6_3.pdf)
- [31] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [32] *Газовая хроматография* [online]. [cit. 2018-05-12] Dostupné z: <http://gigabaza.ru/doc/30533.html>
- [33] Yates, J. R. (2004): Mass spectral analysis in proteomics. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 33: 297–316.
- [34] BOČÁNEK, Ondřej. *Analýza glykoproteinů pomocí hmotnostní spektrometrie*. 2014.
- [35] Wang Y., Zhang J., Gu X., Zhang X-M. (2005) Protein identification assisted by the prediction of retention time in liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 826, 122-128
- [36] de Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007): *Mass spectrometry: Principles and Applications*. Third Edition. John Wiley and Sons Ltd, England.

- [37] C. S. Lane (2005) Mass spectrometry-based proteomics in the life science. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 848-869
- [38] Koppenaal, D. W., Barinaga, C. J., Denton, M. B., Sperline, R. P., Hieftje, G. M., Schilling, G. D., Iv, I. V. (2005): MS detectors. *Analytical chemistry* 77(21):418-A.
- [39] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

GC - Gas chromatography/ Plynová chromatografie

MS - Mass spectrometry/ Hmotnostní spektrometrie

SPME - Mikroextrakce tuhou fází /Solid-phase microextraction

TOF - Detektor doby letu / Time of flight

HS-SPME - Headspace SPME

DI-SPME - Přímá SPME/ Direct immersing SPME

PDMS/DVB - Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene

DVB/CAR/PDMS - Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane

MALDI - Ionizace laserem za přítomnosti matrice/Matrix-assisted laser desorption/ionization

ESI - Electrospray ionisation

HPLC - Vysokoúčinná kapalinová chromatografie / High-performance liquid chromatography

TCD - Tepelně-vodivostní detektor / Thermal Conductivity Detector

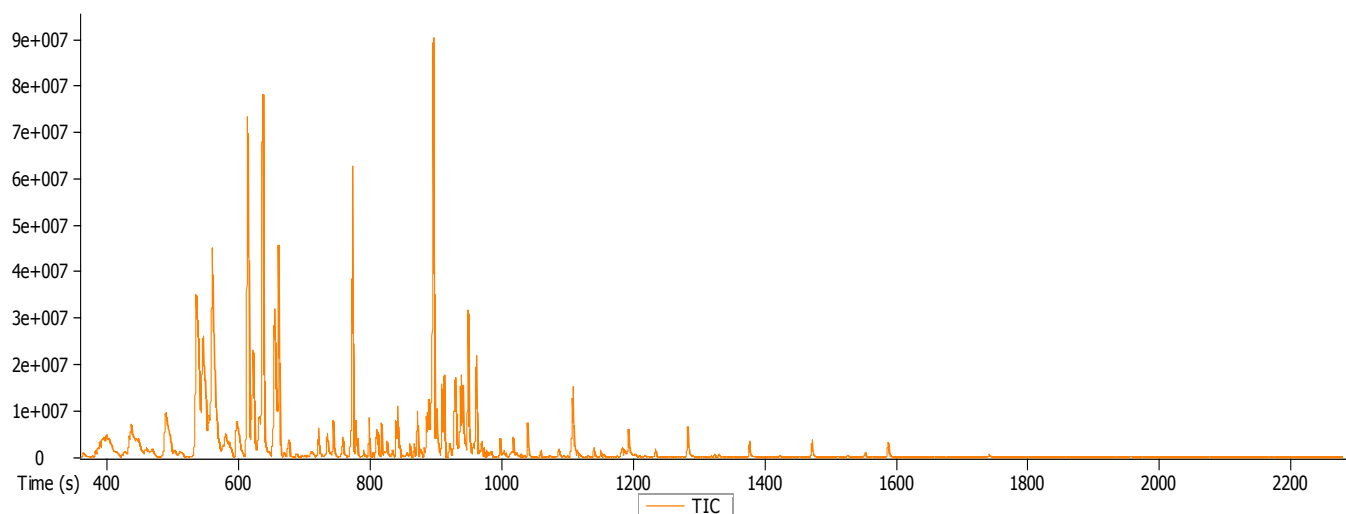
FID - Plamenový ionizační detektor / Flame ionization detector

ECD - Detektor elektronového zachytu/ Electron Capture Detector

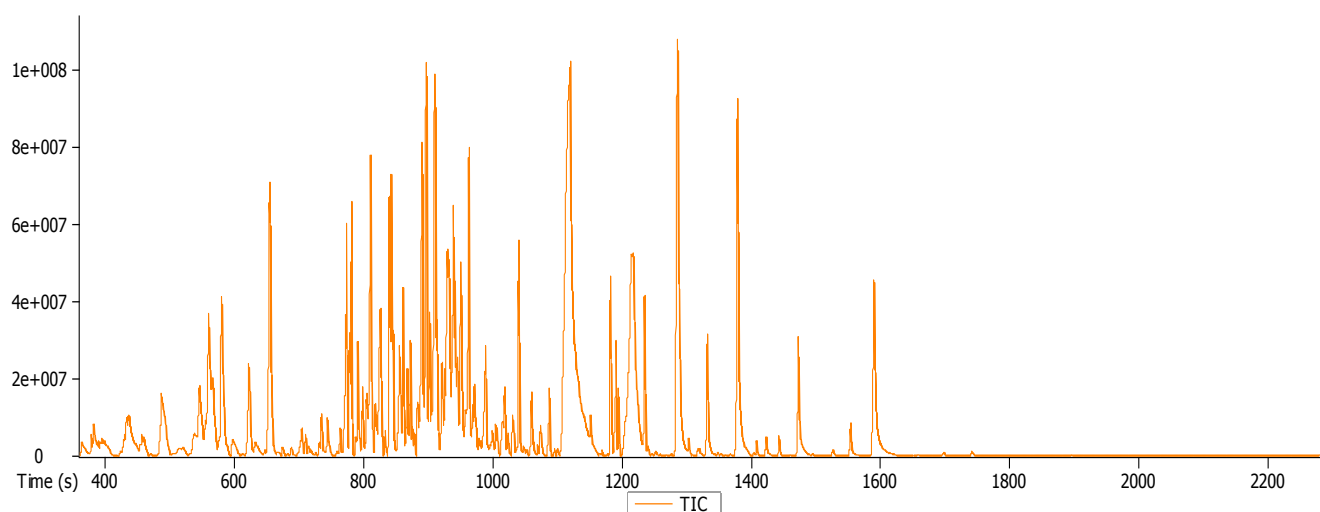
IT - Iontové pasti

Q - Kvadrupólové analyzátory

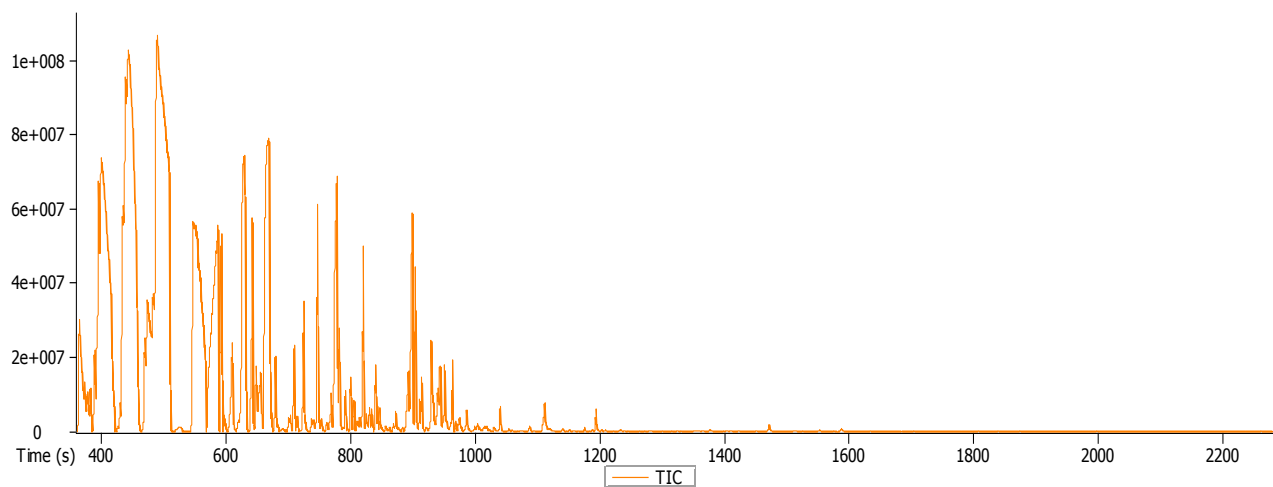
## 8 PŘÍLOHA



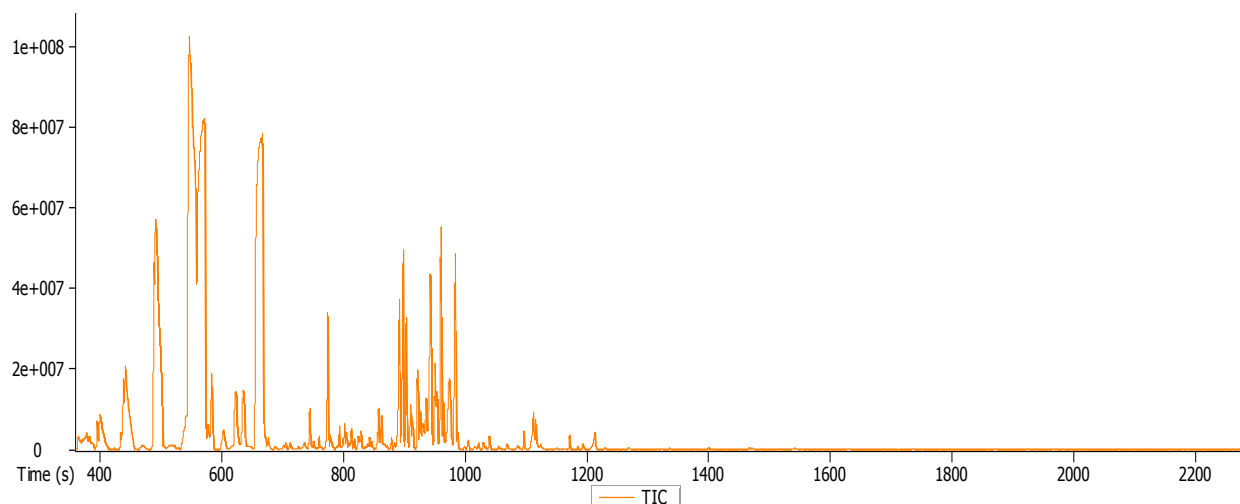
Obrázek 19: Chromatogram Meduňka lékařská nať získané destilace vodní parou



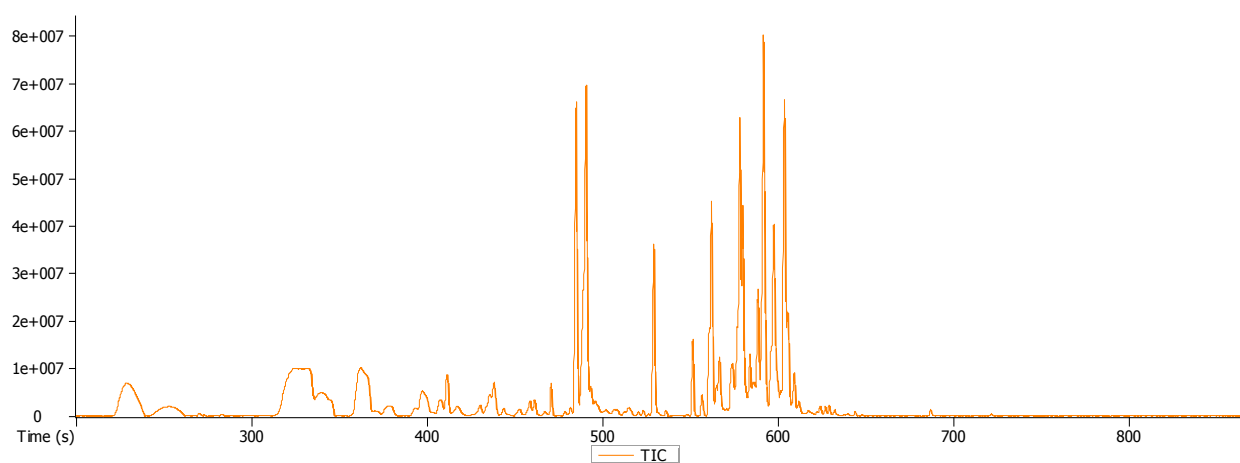
Obrázek 20: Chromatogram „Třezalka nať“ získané destilace vodní parou



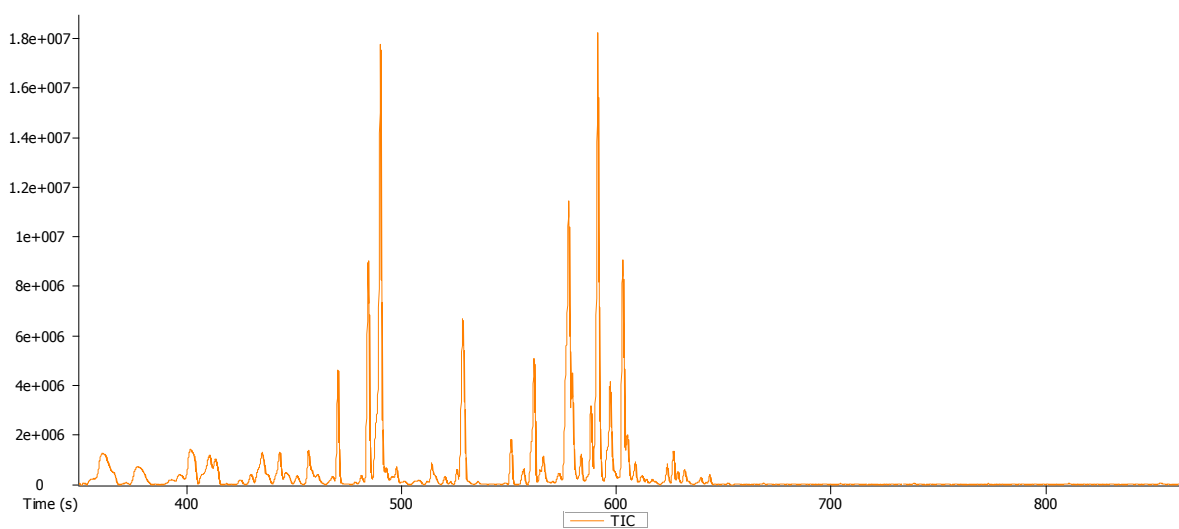
Obrázek 21: Chromatogram „Balzám na nervy“ získané destilace vodní parou



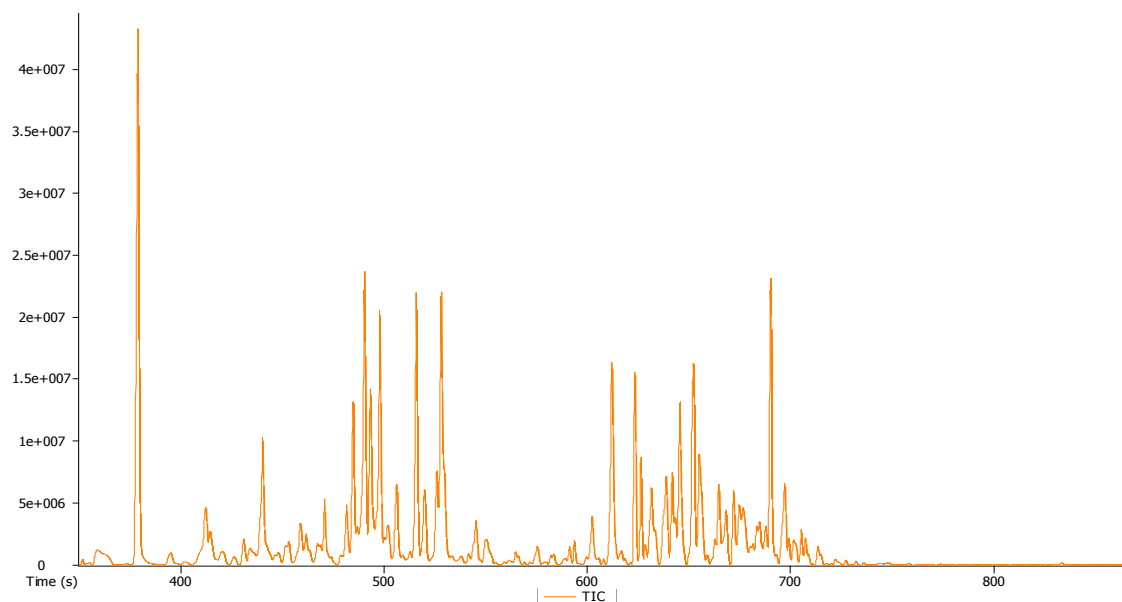
Obrázek 22: Chromatogram „Nervová čajová směs“ získané destilace vodní parou



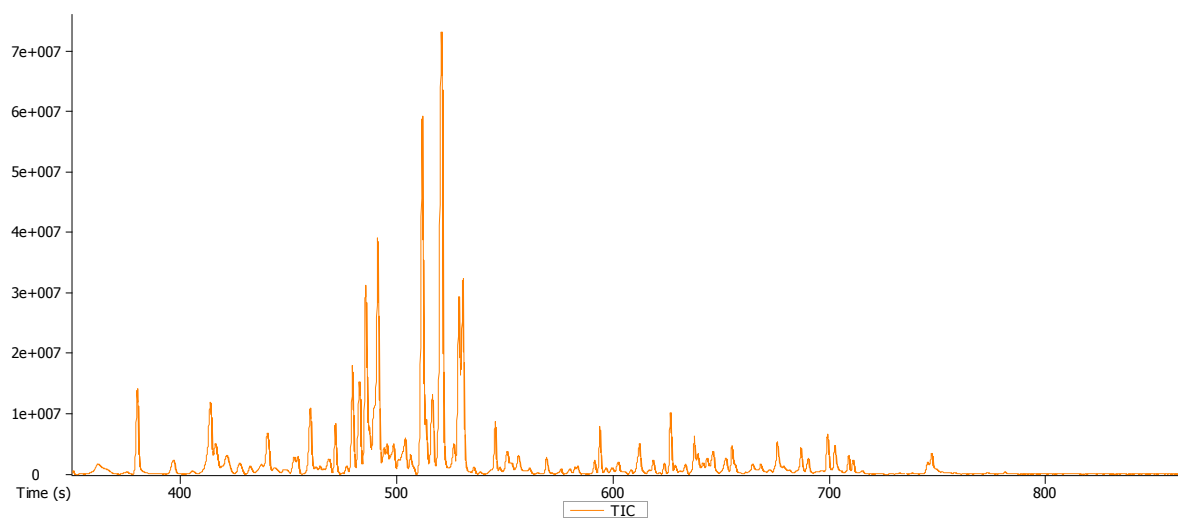
Obrázek 23: Chromatogram „Třezalka nat'“ metodou SPME; suchý vzorek; sede vlákno



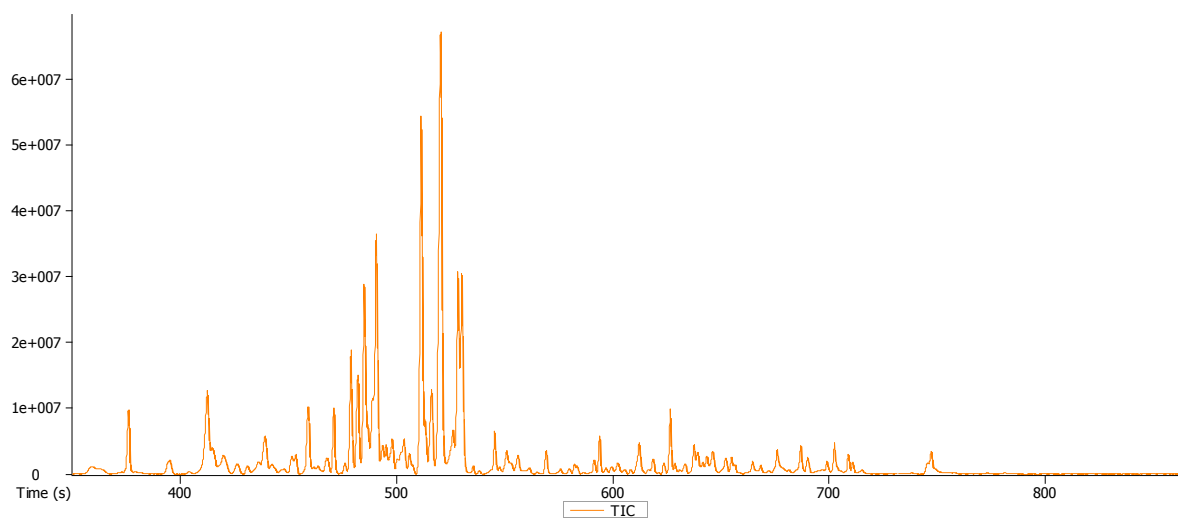
Obrázek 24: Chromatogram „Třezalka nat'“ metodou SPME; suchý vzorek; modré vlákno



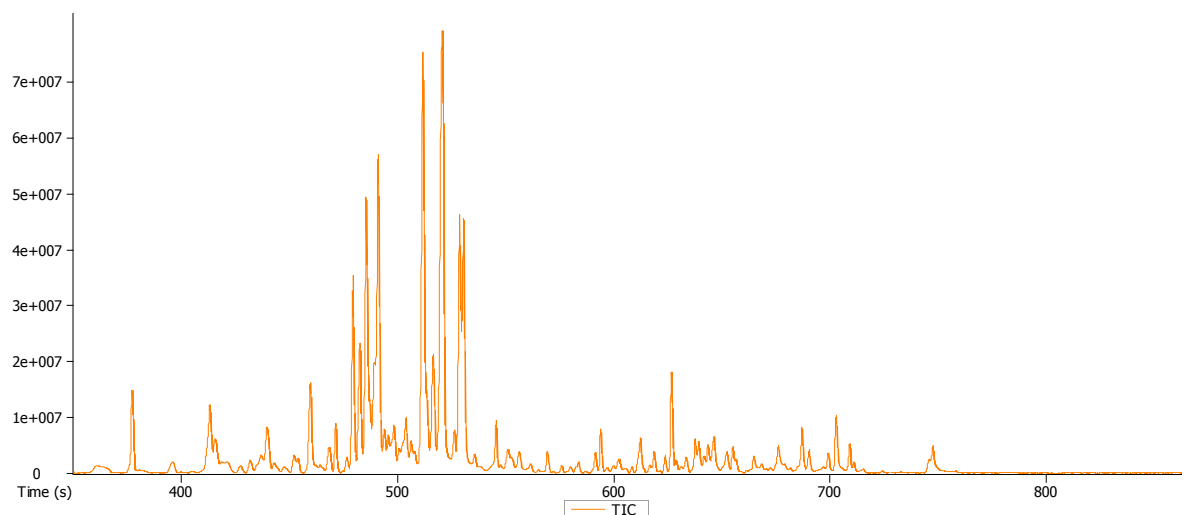
Obrázek 25: Chromatogram „Třezalka nat“ metodou SPME; výluh 3h; sede vlákno „



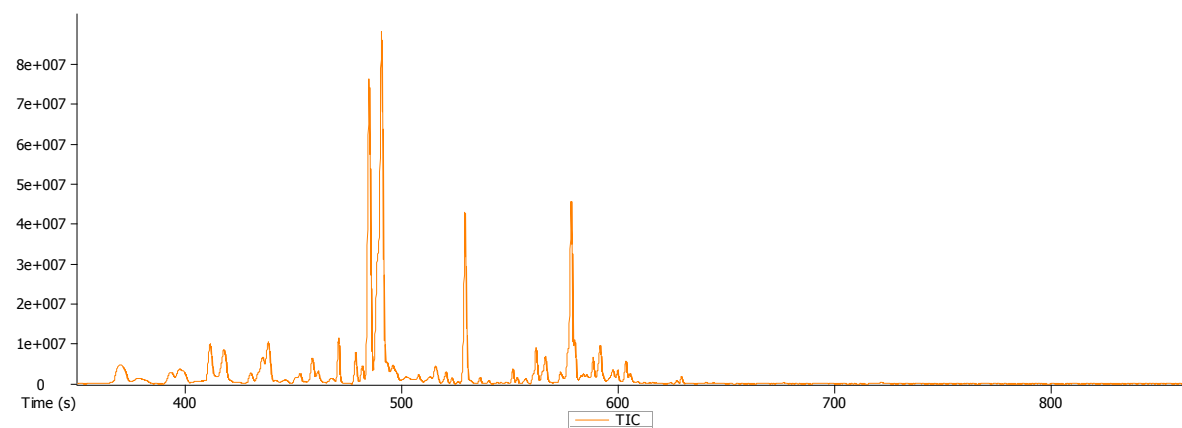
Obrázek 26: Chromatogram „Třezalka nat“ metodou SPME; výluh 3h; modré vlákno



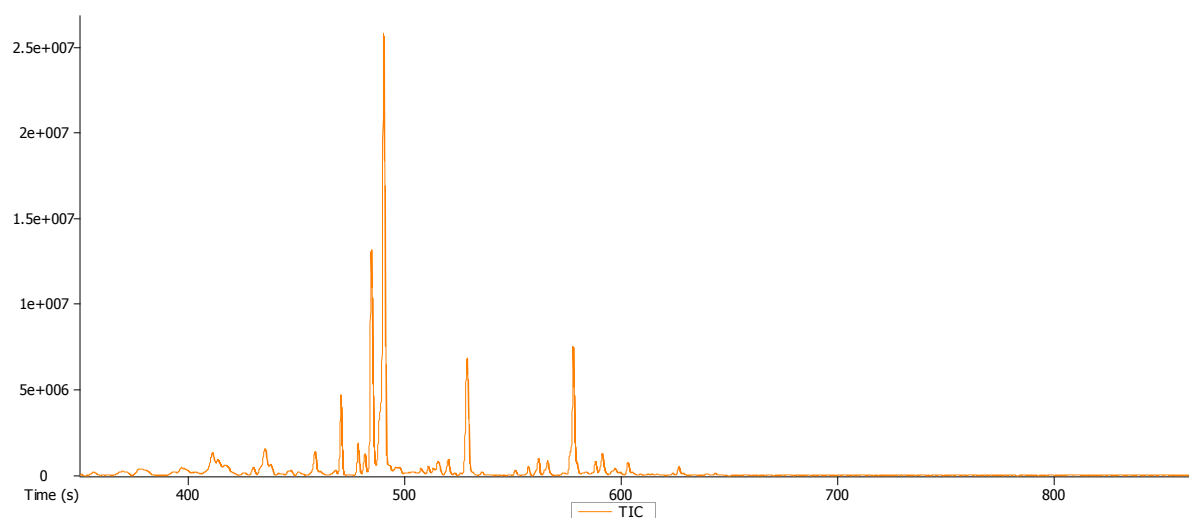
Obrázek 27: Chromatogram „Třezalka nat“ metodou SPME; vařeny čaj; modré vlákno



Obrázek 28: Chromatogram „Třezalka nat“ metodou SPME; vařeny čaj; sede vlákno

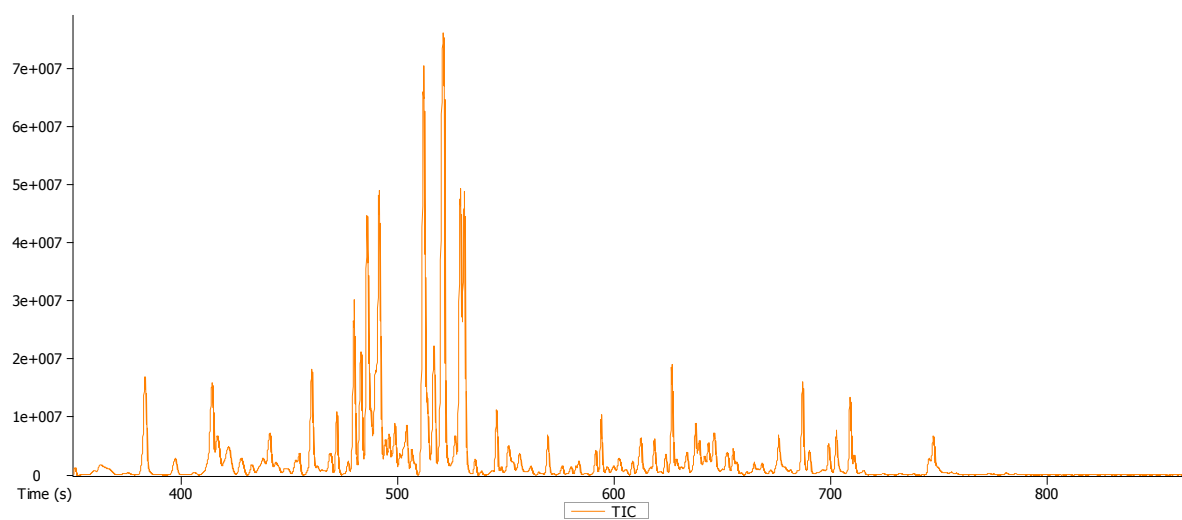


Obrázek 29: Chromatogram „Meduňka lékařská nat“ metodou SPME; suchy vzorek; sede vlákno

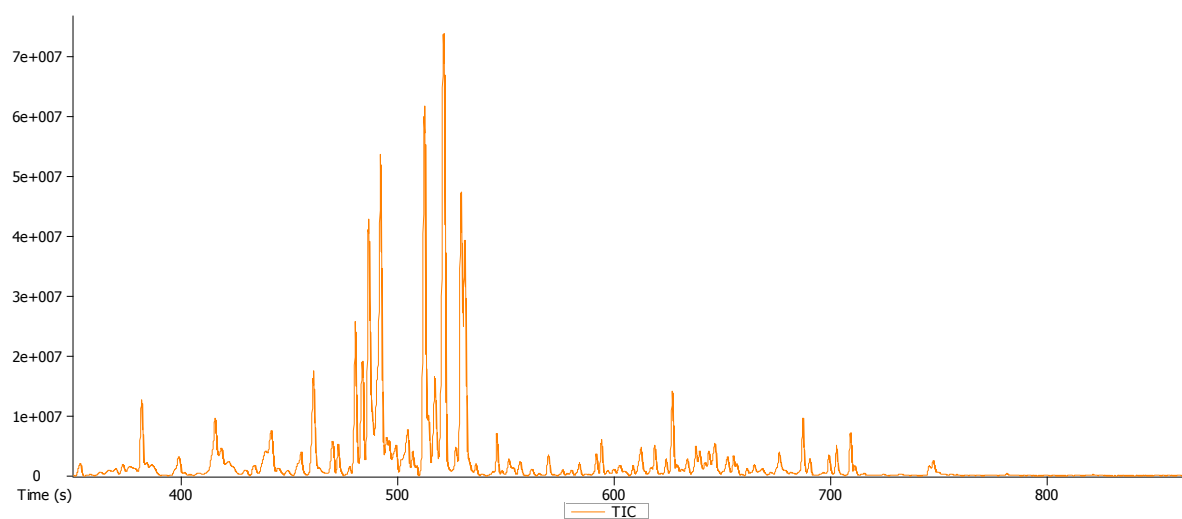


Obrázek 30: Chromatogram „Meduňka lékařská nat“ metodou SPME; suchy vzorek; modré vlákno

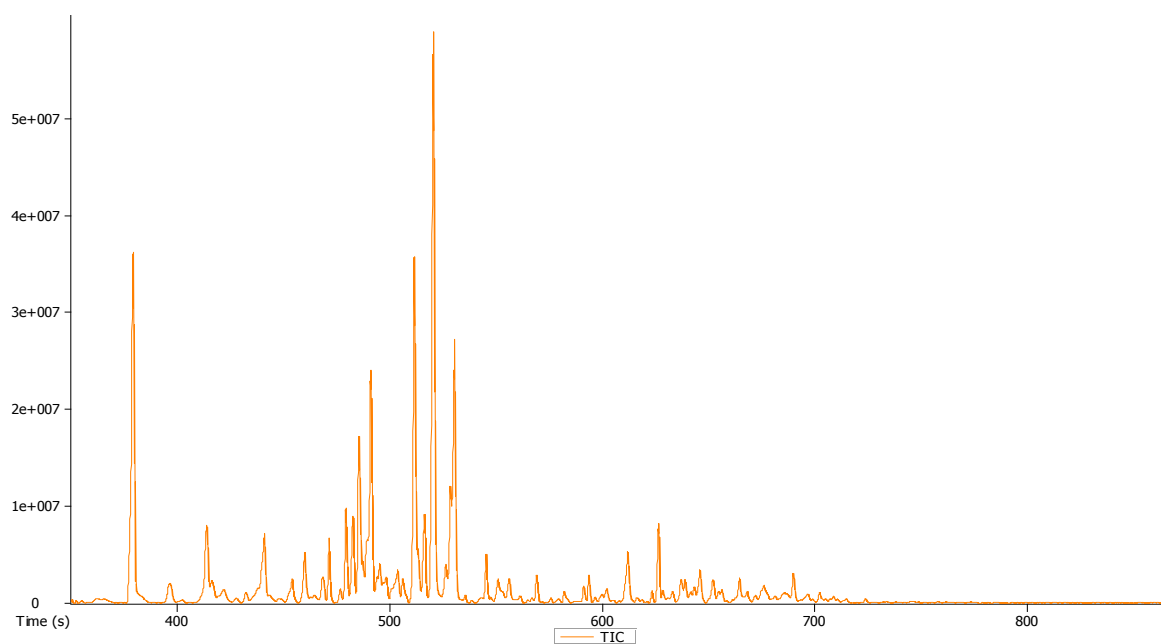




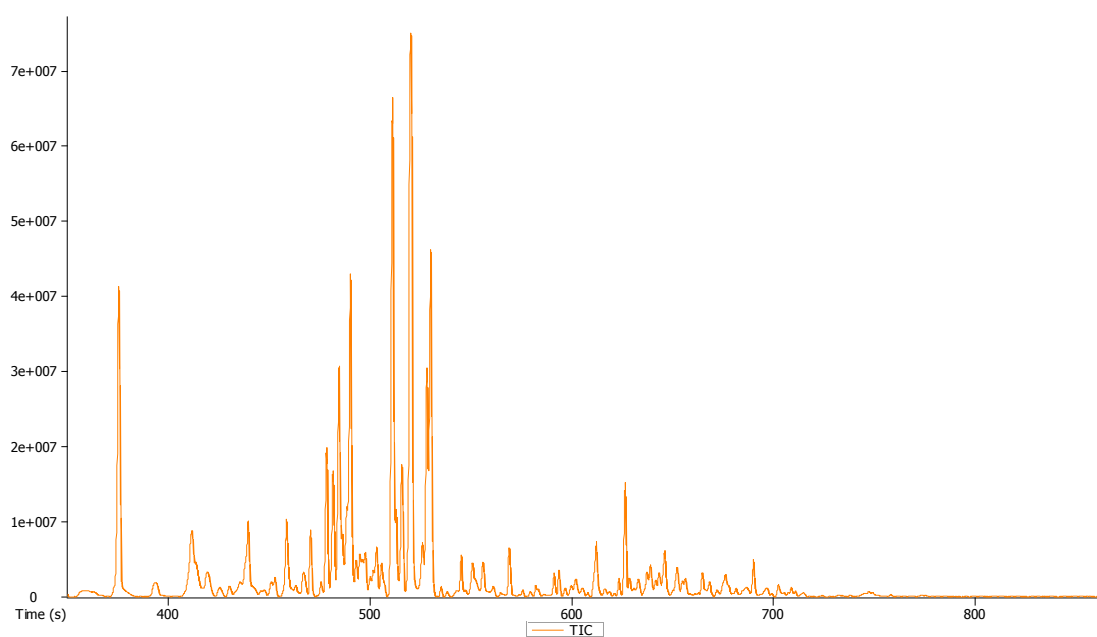
Obrázek 31: Chromatogram „Meduňka lékařská nat“ metodou SPME; vařeny čaj; modré vlákno



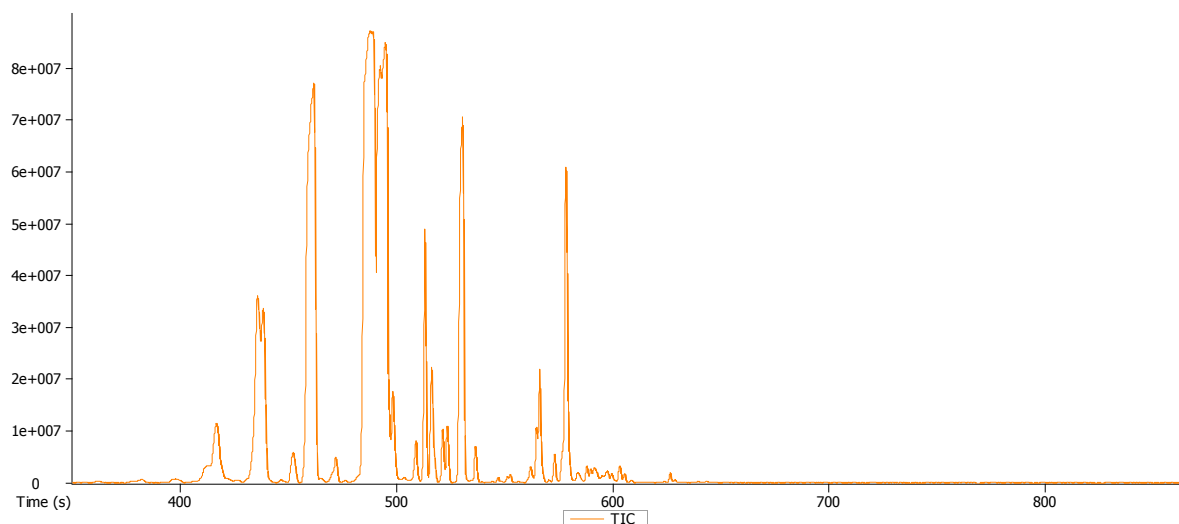
Obrázek 32: Chromatogram „Meduňka lékařská nat“ metodou SPME; vařeny čaj; šedé vlákno



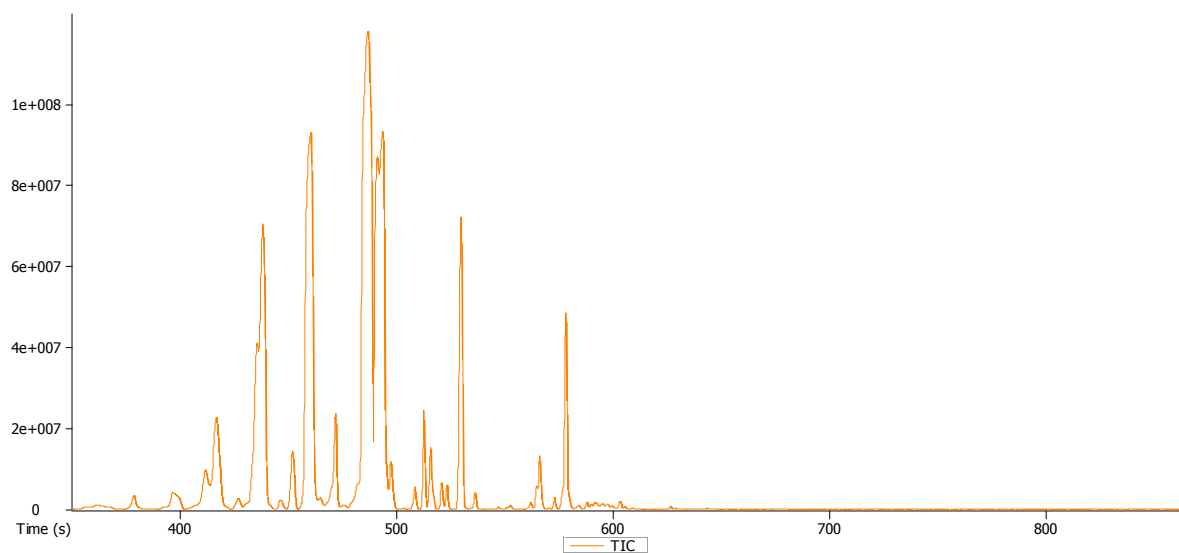
Obrázek 33: Chromatogram „Meduňka lékařská nať“ metodou SPME; výluh 3h; šedé vlákno



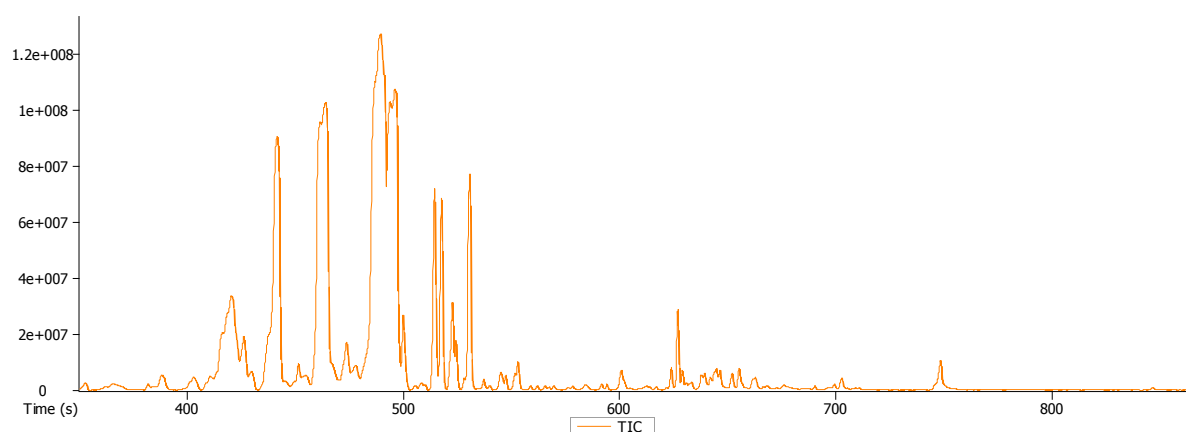
Obrázek 34: Chromatogram „Meduňka lékařská nať“ metodou SPME; výluh 3h; modré vlákno



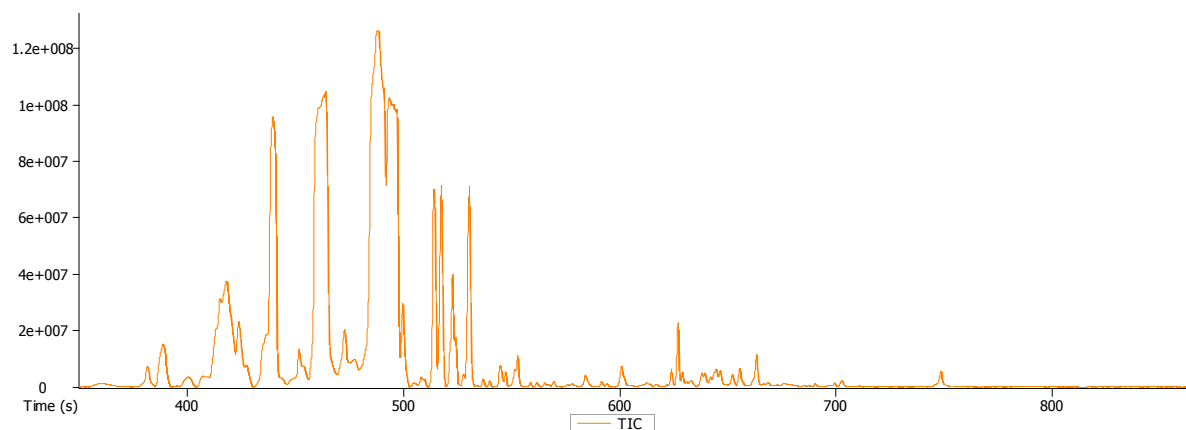
Obrázek 35: Chromatogram „Balzám na nervy“ metodou SPME; suchý vzorek; šedé vlákno



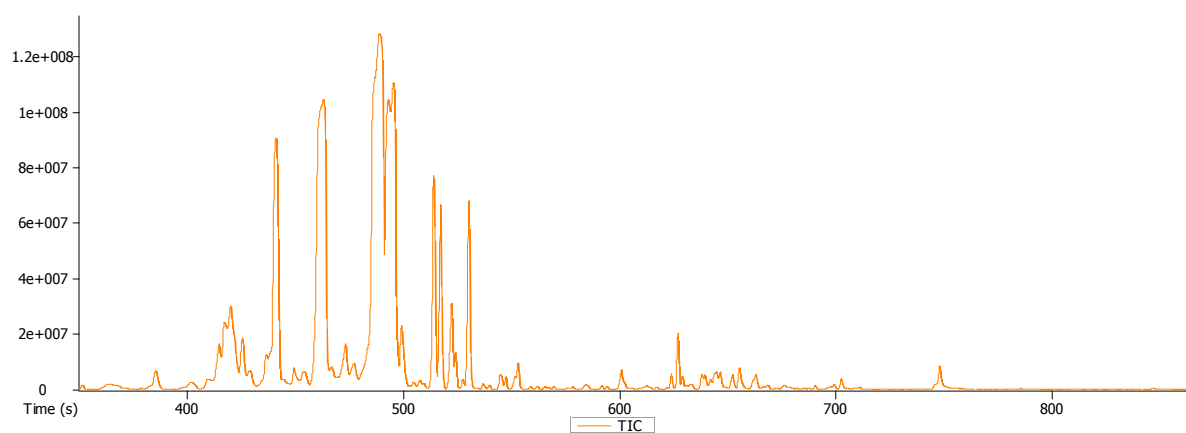
Obrázek 36: Chromatogram „Balzám na nervy“ metodou SPME; suchý vzorek; modré vlákno



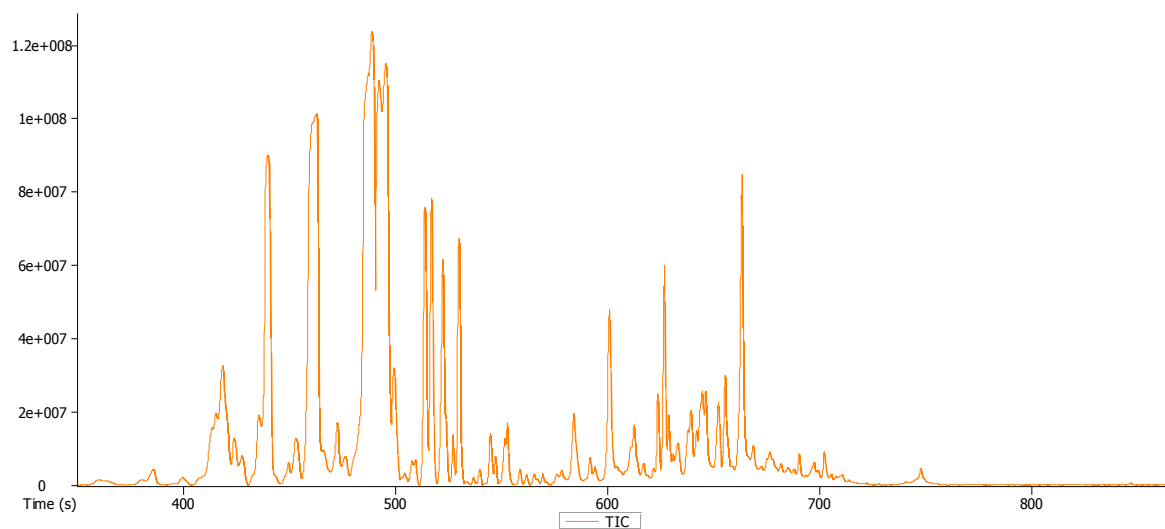
Obrázek 37: Chromatogram „Balzám na nervy“ metodou SPME; vařený čaj; šedé vlákno



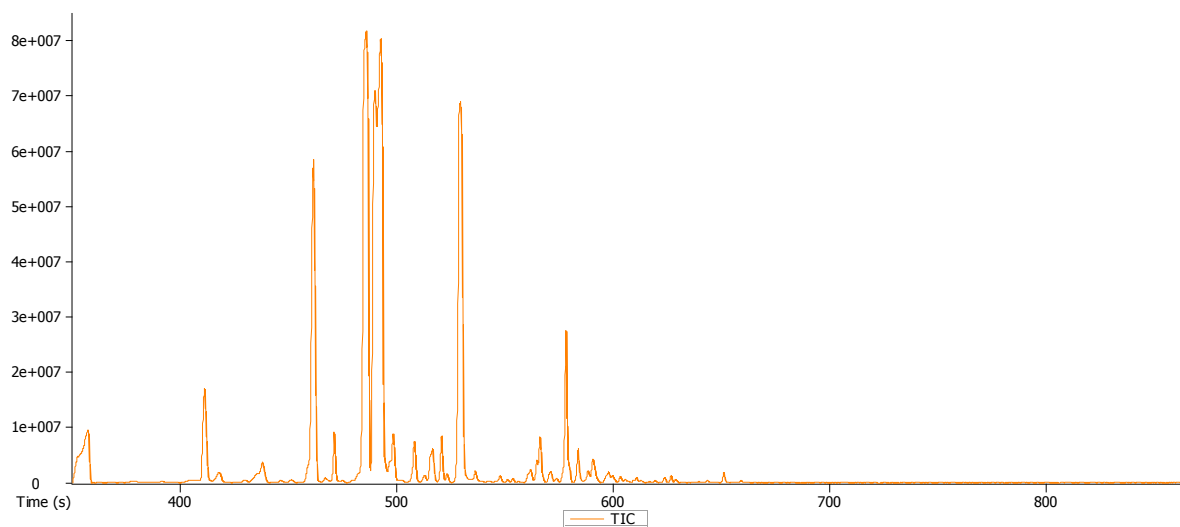
Obrázek 38: Chromatogram „Balzám na nervy“ metodou SPME; vařený čaj; modré vlákno



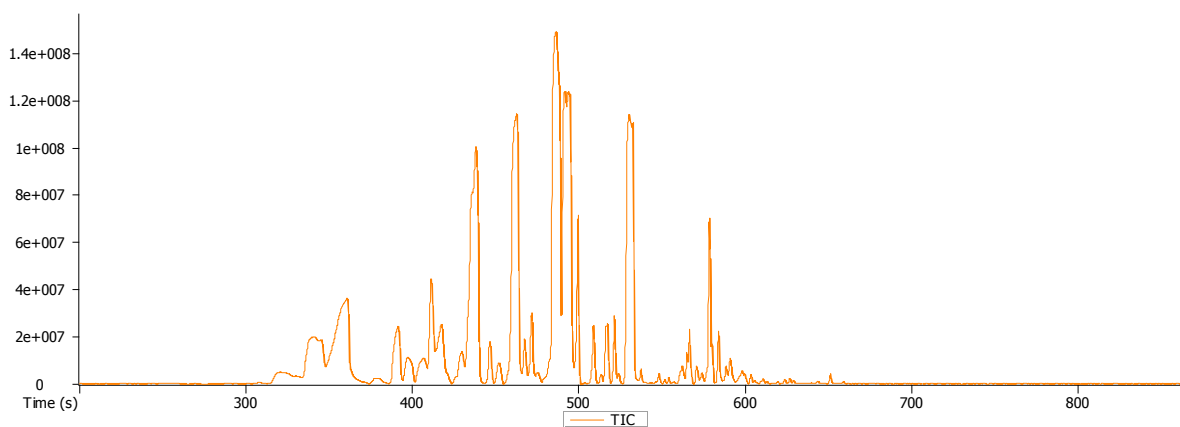
Obrázek 39: Chromatogram „Balzám na nervy“ metodou SPME; výluh 3h; šedé vlákno



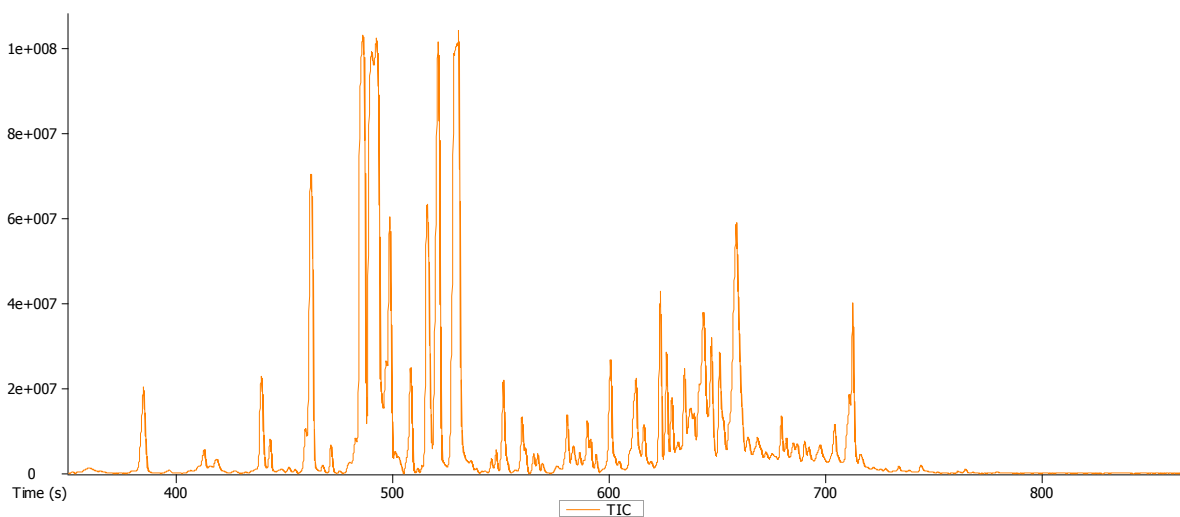
Obrázek 40: Chromatogram „Balzám na nervy“ metodou SPME; výluh 3h; modré vlákno



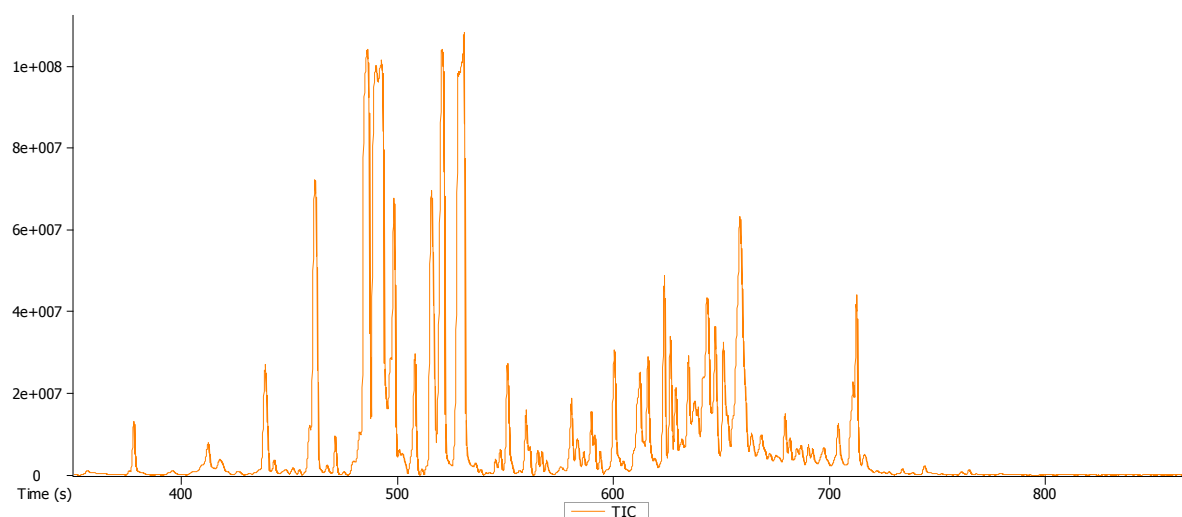
Obrázek 41: Chromatogram „Nervová čajová směs“ metodou SPME; suchý vzorek; šedé vlákno



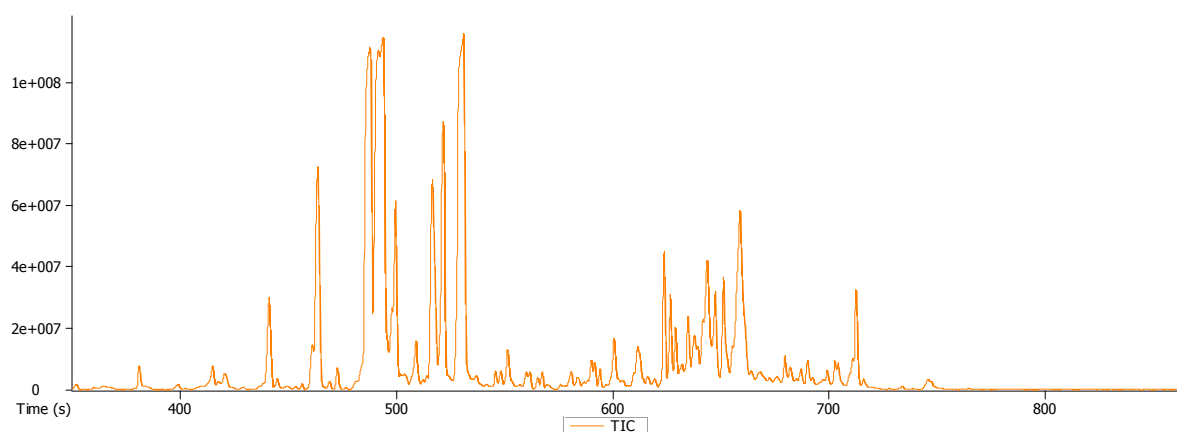
Obrázek 42: Chromatogram „Nervová čajová směs“ metodou SPME; suchý vzorek; modré vlákno



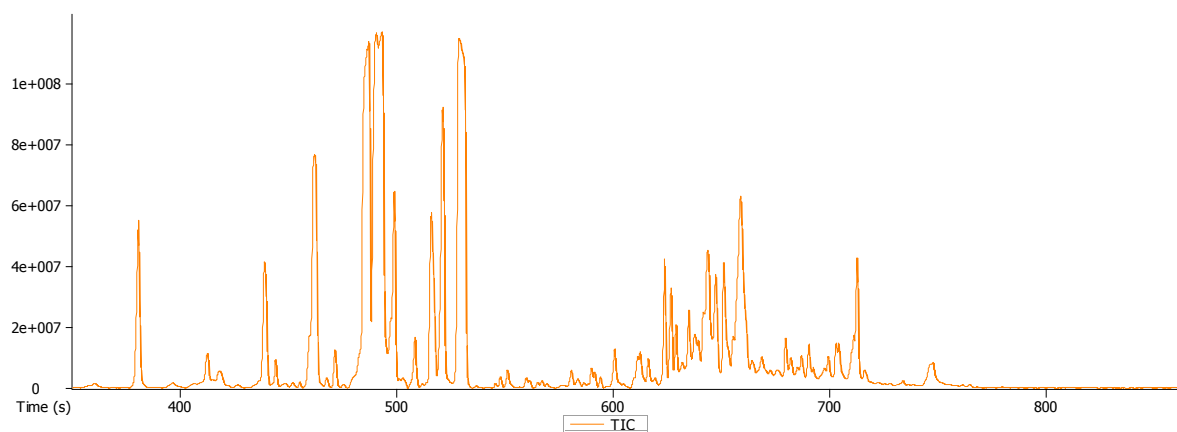
Obrázek 43: Chromatogram „Nervová čajová směs“ metodou SPME; výluh 3h; šedé vlákno



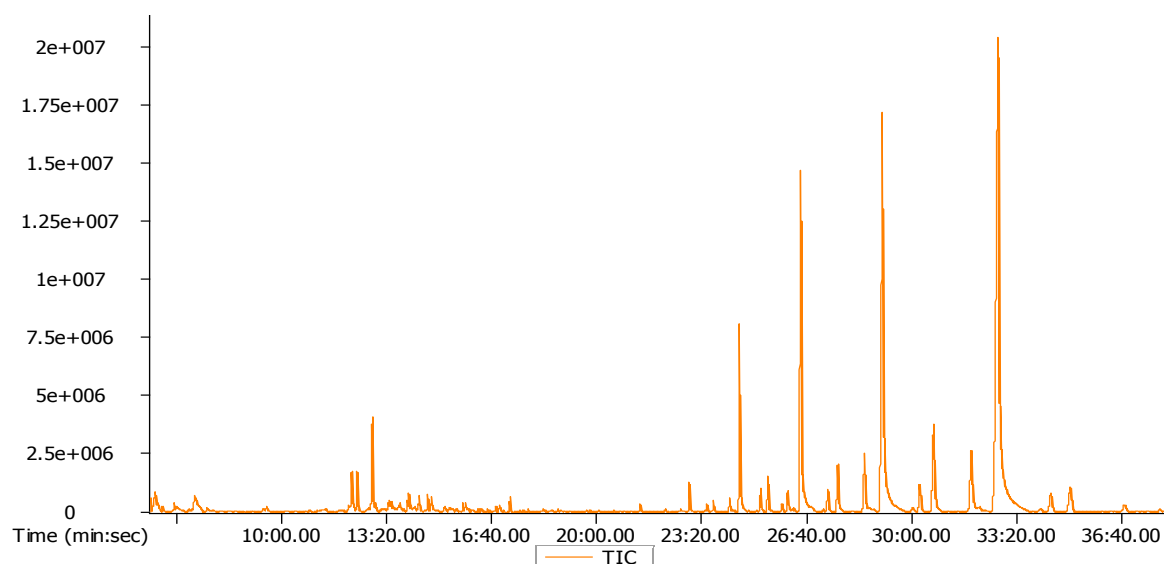
Obrázek 44: Chromatogram „Nervová čajová směs“ metodou SPME; výluh 3h; modré vlákno



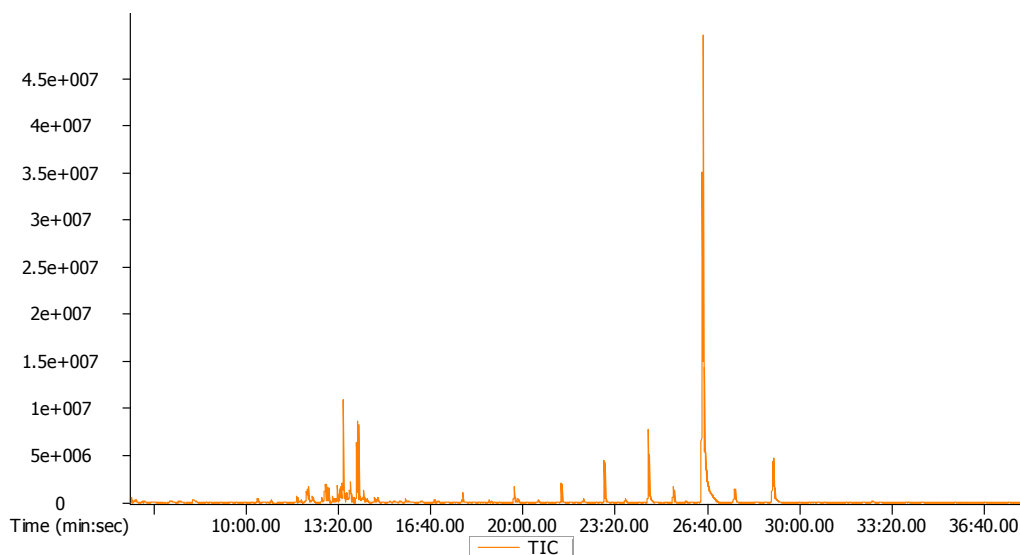
Obrázek 45: Chromatogram „Nervová čajová směs“ metodou SPME; vařený čaj; šedé vlákno



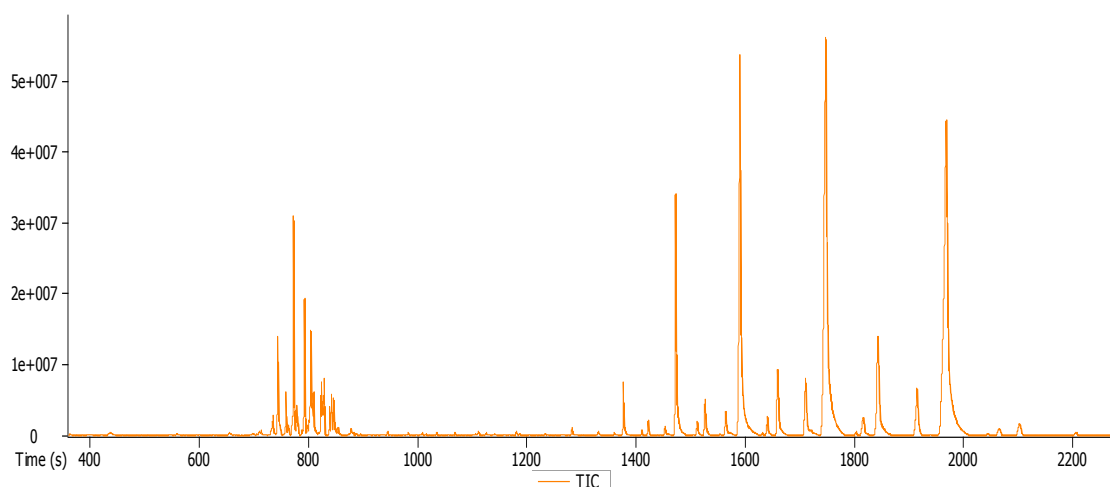
Obrázek 46: Chromatogram „Nervová čajová směs“ metodou SPME; vařený čaj; modré vlákno



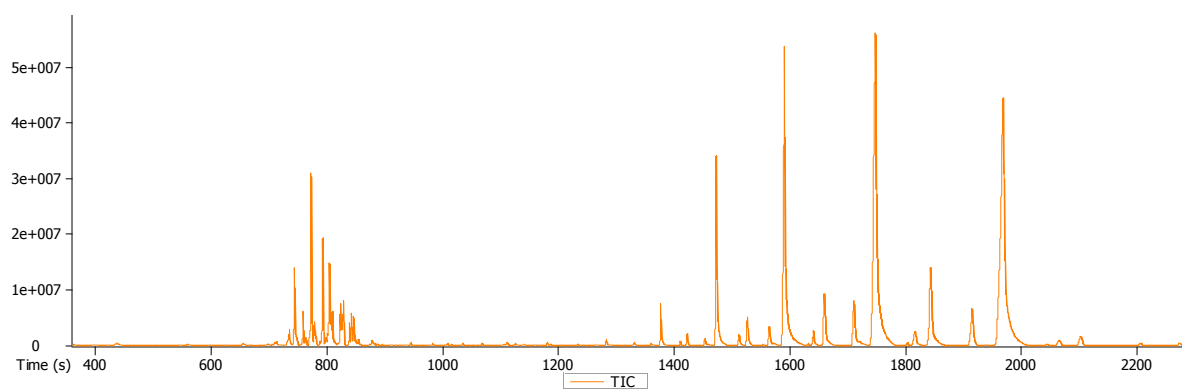
Obrázek 47: Chromatogram „Meduňka lékařská nat“ získané extrakce do hexanu



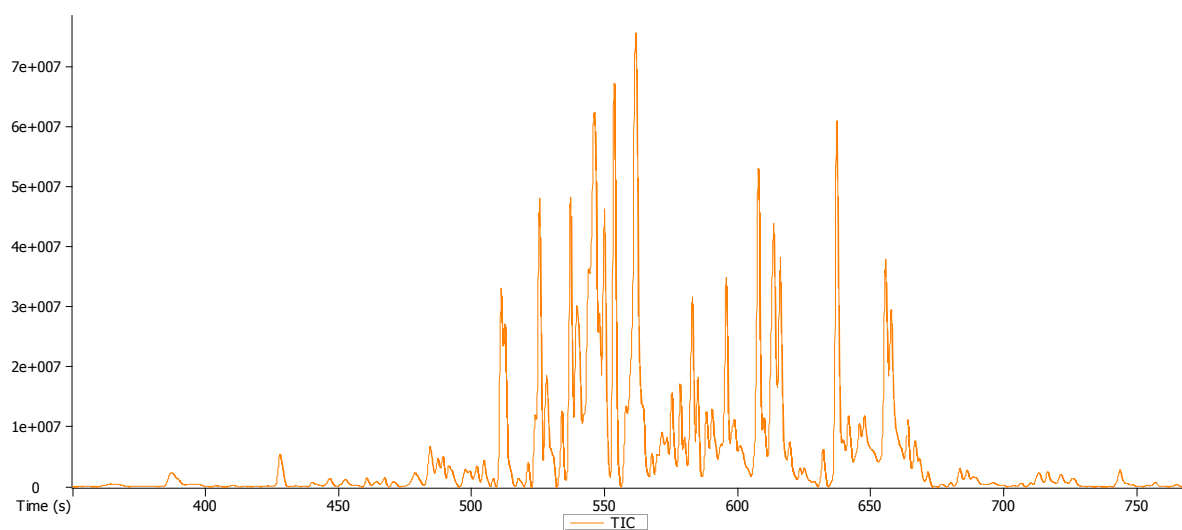
Obrázek 48: Chromatogram „Třezalka nat“ získané extrakce do hexanu



Obrázek 49: Chromatogram Balzám na nervy získané extrakce do hexanu



Obrázek 50: Chromatogram „Nervová čajová směs“ získané extrakce do hexanu



Obrázek 51: Chromatogram „Persen Forte“ získané extrakce do hexanu